MOLEKULARE CHARAKTERISIERUNG DER GENE FÜR EIN PROTEIN (OmpA) DER ÄUSSEREN MEMBRAN VON ENTEROBACTER AEROGENES, SHIGELLA DYSENTERIAE UND SERRATIA MARCESCENS

DISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

der Fakultät für Biologie
der Eberhard - Karls - Universität Tübingen

vorgelegt von
GABRIELE BRAUN
aus Karlsruhe

1983

UNIV.
LEIDEN
1921

MOLEKULARE CHARAKTERISIERUNG DER GENE FÜR EIN PROTEIN (OmpA) DER ÄUSSEREN MEMBRAN VON ENTEROBACTER AEROGENES, SHIGELLA DYSENTERIAE UND SERRATIA MARCESCENS

DISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

der Fakultät für Biologie
der Eberhard - Karls - Universität Tübingen

vorgelegt von
GABRIELE BRAUN
aus Karlsruhe

1983

Tag der mündlichen Prüfung 20.10.1983

Dekan Prof. Dr. E. Kulzer

1. Berichterstatter Prof. Dr. U. Henning

2. Berichterstatter Prof. Dr. V. Braun

Die vorliegende Dissertation wurde von Januar 1981 bis Oktober 1983 am Max-Planck-Institut für Biologie in Tübingen in der Abteilung von Herrn Prof. Dr. U. Henning angefertigt.

Bei Herrn Professor Henning möchte ich mich herzlich bedanken, daß er mir ermöglichte, diese Arbeit in seinem Labor durchzuführen, für seine jederzeit hilfreiche Unterstützung und sein Interesse am Fortgang der Arbeit.
Besonders bedanken möchte ich mich bei Dr. S. T. Cole.
Er ist am Zustandekommen dieser Arbeit durch seine ständige Hilfsbereitschaft und seine wertvollen Ratschläge maßgeblich beteiligt.
Dank schulde ich Frau Marga Maldener und Herrn Roland Freudl für die Bereitstellung von Colicin-Präparaten, Herrn Dr. Renato Morona für Phagen und Frau Barbara Breitenbend für Ihre Fotoarbeiten.
Allen Mitarbeitern gilt meine tiefe Dankbarkeit für eine harmonische und freundschaftliche Zusammenarbeit.

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41547601_0009

Inhaltsverzeichnis

		Seite
1.	EINLEITUNG	1
2.	MATERIAL UND METHODEN	9
2.1.	Escherichia coli K12 Stämme und Bakteriophagen	9
2.2.	Phagen und Plasmide als Klonierungsvektoren	10
2.3.	Medien und Lösungen	12
2.4.	Chemikalien	17
2.5.	Mikrobiologische Methoden	18
2.5.1.	Kulturbedingungen für Bakterien	18
2.5.2.	Bakterielle Konjugation	19
2.5.3.	Test auf Phagenempfindlichkeit	19
2.5.4.	Test auf Phagenbindung	20
2.5.5.	Test auf Empfindlichkeit gegenüber Bacteriocinen	20
2.5.6.	Transformation von Bakterien und Transfektion mit λ-Phagen-DNA	21
2.5.7.	Transfektion von JM103 mit rekombinanter M13mp8- und M13mp9-Phagen-DNA	21
2.5.8.	Vermehrung von λ-Phagen	22
2.5.8.1.	Plattenlysat	22
2.5.8.2.	Infektion mit λ-Phagen in flüssigem Medium	23
2.5.8.3.	Induktion des λ-Prophagen	23
2.5.8.4.	Vermehrung von rekombinanten M13-Phagen	24
2.6.	Molekularbiologische Methoden	24
2.6.1.	Aufarbeitung von Phagen-DNA	24
2.6.1.1.	Fällung von λ-Phagen mit Polyäthylenglykol 6000, CsCl-Step-Gradient und Extraktion ihrer DNA mit Phenol	24
2.6.1.2.	Fällung von M13-Phagen und Extraktion von M13-Phagen-DNA für die DNA-Sequenzierung nach Sanger	25
2.6.2.	Isolierung und Reinigung von Plasmid-DNA	26

UNIV. LEIDEN BIBL.

Seite

2.6.2.1. Minipräparation von Plasmid-DNA 26

2.6.2.2. Präparative Aufarbeitung von Plasmid-DNA: Alkalische Extraktion und CsCl-Ethidiumbromid-Dichtegradienten-Zentrifugation 26

2.6.3. DNA-Mengenbestimmung 28

2.6.4. Nukleinsäurepräzipitation 29

2.6.5. Arbeit mit DNA-spezifischen Enzymen 29

2.6.5.1. Bedingungen für die DNA-Spaltung mit Restriktionsenzymen 29

2.6.5.2. Auffüllreaktion für DNA-Fragmente mit überhängendem 5'-Ende 30

2.6.5.3. Ligierungen 30

2.6.5.4. Dephosphorylierungen von DNA-Fragmenten mit alkalischer Phosphatase 31

2.6.5.5. 5'-^{32}P-Markierung von Restriktions-Fragmenten 31

2.6.5.6. Nicktranslation 32

2.6.6. DNA-Gelelektrophorese 32

2.6.6.1. Agarose- und Polyacrylamidgele für analytische und präparative Trennungen von DNA-Fragmenten 32

2.6.6.2. DNA-Sequenzgele 33

2.6.6.3. Farbmarker und DNA-Längenstandards für Gelelektrophoresen 34

2.6.7. DNA-Erkennung auf Gelen 35

2.6.7.1. Ethidiumbromid-Färbung 35

2.6.7.2. Autoradiographie 35

2.6.7.3. UV-'Shadowing' 35

2.6.8. Isolierung von DNA-Fragmenten aus Gelen über Elektroelution oder Diffusion 36

2.6.8.1. Sucrose-Mischgradient 37

2.6.9. DNA-Säulenchromatographie 38

2.6.9.1. Ionenaustausch-Chromatographie von DNA über DEAE-Cellulose-Säulen 38

2.6.9.2. DNA-Säulen-Chromatographie mit Sephadex G 100 38

2.6.10. DNA auf Nitrocellulosefilter für Hybridisierungsversuche 39

Seite

2.6.10.1. Transfer von DNA auf Nitrocellulose-Filter 39

2.6.10.2. Transfer von λ-Plaques auf Nitrocellulosefilter 40

2.6.10.3. Transfer von Bakterienkolonien auf Nitrocellulosefilter 40

2.6.11. DNA:DNA-Hybridisierung 40

2.6.12. DNA-Sequenzierung nach der chemischen Methode von Maxam und Gilbert 41

2.6.12.1. Guanin-spezifische Abbaureaktion 41

2.6.12.2. Purin (A+G)-spezifische Abbaureaktion 42

2.6.12.3. Pyrimidin (C+T)-spezifische Abbaureaktion 42

2.6.12.4. Cytosin-spezifische Abbaureaktion 43

2.6.12.5. DNA-Fällung 43

2.6.12.6. Piperidinspaltung 44

2.6.13. DNA-Sequenzierung nach der enzymatischen Methode von Sanger 44

2.6.13.1. Komplementäre Anlagerung des Primers an die Matrizen-DNA 45

2.6.13.2. Sequenzreaktionen 45

3. ERGEBNISSE 46

3.1. Klonierung der ompA-Gene von Shigella dysenteriae, Enterobacter aerogenes und Serratia marcescens 46

3.1.1. Lokalisierung der ompA-Gene 46

3.1.2. Konstruktion von λompA transduzierenden Phagen 47

3.1.3. Analyse der rekombinanten λ-Phagen-DNA 47

3.1.4. Homologie der ompA-Gene 48

3.2. Lagebestimmung und Subklonierung der Gene 49

3.2.1. Kartierung der λompA-Sh-DNA, Lokalisierung des ompA-Gens und Konstruktion von Hybridplasmiden 50

3.2.2. Lokalisierung des ompA-Gens auf λ-ompA-Se und seine Subklonierung 51

Seite

3.2.3. Klonierung der EcoRI-Fragmente aus λompA-En und λompA-Se in pHSG 415 52

3.2.4. Restriktionskarten und tabellarische Auflistung der bei Restriktionsverdaus erhaltenen DNA-Fragmente 54

3.3. Ausprägung der klonierten ompA-Gene im fremden Wirt 72

3.3.1. Ausprägung in λompA lysogenen E. coli K12 72

3.3.2. Eigenschaften der λompA lysogenen E. coli K12-Stämme 74

3.3.3. pTU 3Sh, pTU 7En, pTU 5Se tragende E. coli-Zellen und ihre Eigenschaften 75

3.4. Sequenzierungsstrategien 77

3.5. Die ompA-Gene 79

2.5.1. Nukleotidsequenzen der ompA-Gene von Shigella, Enterobacter und Serratia 80

3.5.2. Analyse der DNA-Sequenzen 87

3.5.2.1. Ausmaß der Homologien der ompA-Gene in der Gruppe der Enterobacteriaceae 87

3.5.2.2. Promotor- und "Leader"-Sequenz 89

3.5.2.3. Die Strukturgene 90

3.5.2.4. Sekundärstrukturen der m-RNA 91

3.5.2.5. Codon-Benützung 92

3.6. Eigenschaften der Primärstruktur der ompA-Proteine 94

4. DISKUSSION 98

5. ZUSAMMENFASSUNG 109

6. LITERATURVERZEICHNIS 111

Im Text wurden folgende Abkürzungen verwendet:

Amp^r	Resistenz gegen Ampicillin
ATCC	American Type Culture Collection
ATP	Adenosintriphosphat
Bisacrylamid	N,N'-Methylendiacrylamid
Bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
^oC	Grad Celsius
c-Amp	cyclisches Adenosinmonophosphat
Cm^r	Resistenz gegen Chloramphenicol
cpm	counts per minute
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
ddATP	Didesoxyadenosintriphosphat
ddCTP	Didesoxycytidintriphosphat
ddGTP	Didesoxyguanosintriphosphat
ddTTP	Didesoxythymidintriphosphat
DMS	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
EDTA	Äthylendiamintetraessigsäure
g	Gramm
h	Stunde
IPTG	Isopropyl-thiogalactosid
Kb	Kilobasenpaare
Km^r	Resistenz gegen Kanamycin
l	Liter
LPS	Lipopolysaccharid
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
M_r	relatives Molekulargewicht
m-RNA	Boten-Ribonukleinsäure
ng	Nanogramm
nm	Nanometer

OD_x	Optische Dichte bei x Nanometer
pg	Pikogramm
RNase	Ribonuklease
SDS	Natriumdodecylsulfat
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyläthylendiamin
Tet^r	Resistenz gegen Tetracyclin
Tris	Trishydroxylmethylaminomethan
Upm	Umdrehungen pro Minute
UV	ultraviolett
w/v	Gewichtsprozent
v/v	Volumenprozent
x-Gal	5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl-β-Galactoside
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter

Folgende Begriffe wurden aus dem Englischen übernommen:

"chase"
"flush-end"
"peak"
"primer"
"shot-gun"
"sticky-end"
"UV-shadowing"
"Processing"
"Leader"-Sequenz
"stem"- and "loop"-Strukturen

1. EINLEITUNG

Die räumliche Abgrenzung gegenüber der Umgebung ist die Grundvoraussetzung für alles Leben, d.h. für alle lebenden Organismen. Diese Voraussetzung bildet die biologische Membran (161). Sie schützt die Zelle vor physikalischen und chemischen Umwelteinflüssen. Sie ermöglicht als selektive Permeabilitätsbarriere mit definierter Polarität die Einschränkung des Stoffaustausches zwischen verschiedenen Räumen und das Auslaufen des Cytoplasmas.

Das Cytoplasma einer Bakterienzelle ist von einer komplexen Zellhülle umgeben (13,120). Auf Grund fundamentaler Unterschiede dieser Zellhülle und basierend darauf unterschiedlichen Färbeverhaltens kann man Gram-negative und Gram-positive Bakterien unterscheiden. Während Gram-positive Bakterien um ihre Zelle außerhalb der Cytoplasmamembran meist nur eine dickwandige Mureinschicht ausbilden, besitzen die Gram-negativen nur ein einschichtiges Mureinnetz, dem aber eine zweite Membran, die sogenannte äußere Membran, aufgelagert ist. Zusammen mit der Cytoplasmamembran umschließt sie den zwischen ihnen bestehenden periplasmatischen Raum und verhindert u.a. das Auslaufen von Enzymen, die hier lokalisiert sind. In diesem Raum außerhalb des Cytosols hat die Zelle hydrolytische Enzyme stationiert, die für die Nahrungsaufnahme wichtig sind (137), im Cytoplasma aber zum Selbstverdau führen würden. Weiter finden sich hier Bindeproteine für den aktiven Transport spezifischer Substanzen (96, 151) und Komponenten des chemotaktischen Apparates der Zelle (69).

Die Cytoplasmamembran besteht aus Phospholipiden und Proteinen in nahezu gleichem Verhältnis. In ihr sind wichtige Transportsysteme für die Aufnahme extrazellulärer Substanzen (17,137), Proteine für Chemorezeption (158) und Stoffwechselsysteme, wie Enzyme der oxidativen Phosphorylierung (64), der Synthese von Phospholipiden (40), Lipopolysaccha-

riden (40,143) und Peptidoglycan lokalisiert (130). Auch Komponenten für die Synthese und Segregation von DNA und für die Zellteilung (145) sind in dieser komplexen Membran zu finden.

Das Makromolekül Murein besteht aus einem Netzwerk, in welchem unverzweigte heteropolymere Zuckerketten über Tetrapeptidseitenketten miteinander quervernetzt sind (122,164) und die ganze Zelle als Sacculus umschließen. Diese Mureinschicht schützt die Zelle vor dem Platzen bei zu hohem osmotischem Druck in hypotonischem Medium und ist vermutlich an der Formgestaltung der Bakterien beteiligt (52,75).

Die äußere Membran bildet die Barriere zwischen Zellinnerem und Umgebung. Über die äußere Membran steht die Zelle mit ihrer Umgebung in Kontakt, und hat daher wesentliche Aufgaben hinsichtlich Kommunikation mit der Umwelt zu erfüllen. Strukturell und funktionell bestehen daher erhebliche Unterschiede zur Cytoplasmamembran.

Strukturelle Unterschiede zeigen sich in einer anderen Lipid- und Protein-Zusammensetzung (41,200). Die typische Komponente ist das gut untersuchte Lipopolysaccharid, das als Zellbestandteil nur in der äußeren Membran vorkommt (140). Besonders auffällig ist, daß die äußere Membran hinsichtlich des LPS asymmetrisch aufgebaut ist (59,142,203), das heißt das amphipathische LPS-Molekül ist mit seinem hydrophoben Teil, dem Lipid A, nur in die äußere Hälfte der doppelschichtigen Membran eingelagert (126) und steht hier mit einer ganzen Reihe von Proteinen in Wechselwirkung. Ebenfalls asymmetrisch verteilt sind die Phospholipide. Sie kommen fast ausschließlich in der inneren Hälfte der äußeren Membran vor (73,93). Der Proteingehalt der äußeren Membran macht 9-12 % des Gesamtzellproteins aus.

Dazu gehören Proteine mit den unterschiedlichsten Aufgaben. Viele dieser Proteine bilden Teile von hochspezifischen Transportsystemen (22,49) oder bilder Poren für diffusible Substanzen (66,98,138), stellen Rezeptoren für Bakteriophagen dar (22,67) oder sind beteiligt an der Aufnahme von Bakteriocinen (22,48,146).

Viele von ihnen gehören zu den mengenmäßig weniger vorkommenden Proteinen in der äußeren Membran. Einige davon sind aber induzierbar und können zu Hauptproteinen werden, während andere scheinbar nicht induzierbar sind.

Als Beispiele können eine Reihe von Proteinen unter Bedingungen erniedrigter Eisenionenkonzentration im Medium induziert werden, die für die Aufnahme spezifischer Eisen-Chelatkomplexbildner (135,136) verantwortlich sind und in der Versorgung der Zelle mit Eisenionen eine Rolle spielen. Dazu gehört auch das Rezeptorprotein für den Phagen T6, das gleichzeitig Rezeptor für Colicin K ist (6,111). Sein Strukturgen tsx ist teilweise kloniert (189). Das Protein ist als Monomeres aktiv (205), und seine Verbindung mit LPS (111) ist wichtig für die T6 Phageninfektion (97). Die eigentliche Funktion des Katabolit-reprimierbaren Systems (6) besteht in der Aufnahme von Nukleosiden und Desoxynukleosiden (66,98). Da diese Substanzen die T6-Adsorption nicht hemmen, wurde für dieses Protein das Porenmodell vorgeschlagen (98).

Ein wenig erforschtes Protein ist das Protein a (184), das bei höheren Temperaturen in größeren Mengen in E. coli K12 produziert wird (53). Es ist bekannt, daß das äußere Membranprotein FepA (136) von einer Peptidase der äußeren Membran in ein kleineres Molekül umgesetzt wird (54). Dieser Prozeß läuft nicht in Mutanten ab, denen Protein a fehlt. Möglicherweise ist das Protein a als Protease für die Umsetzung von FepA verantwortlich. Damit hätte es ähnliche Eigenschaften wie die Signalpeptidase (206), die sowohl in der äußeren Membran als auch in der Cytoplasmamembran von E. coli vorkommt. Die Proteine haben auch ein fast gleiches Molekulargewicht.

Unter bestimmten Wachstumsbedingungen erscheinen Proteine in so großen Mengen, daß sie zu Hauptproteinen der äußeren Membran werden. Die Bezeichnung Hauptprotein ist daher mißverständlich und ein relativer Begriff. Wichtig für die Einteilung von äußeren Membranproteinen in Hauptproteine

war die Beobachtung, daß sie unter veränderten Wachstumsbedingungen in relativen Mengen zueinander, aber immer in konstanter Menge pro Membranflächeneinheit vorkommen (5, 101). Das läßt vermuten, daß diese Proteine einen gemeinsamen sehr komplexen Regulationsmechanismus haben (65,123, 155). Zu den induzierbaren Proteinen gehören das lamB-Genprodukt (154) und das PhoE-Protein (188).

Das LamB-Protein wird während des Wachstums auf Maltose und Maltodextrinen induziert. Es dient als Pore (103,130) der Diffusion von Maltose und Matodextrinen. Die aktive Form ist ein Trimeres des Proteins. Darüber hinaus stellt es das Rezeptorprotein für den Phagen lambda dar (31,154).

Das PhoE-Protein wird in großen Mengen ausgeprägt, wenn Zellen in Medium mit geringer Phosphatkonzentration wachsen (149,198). Es ist ebenfalls Porenbildner mit einer gewissen Spezifität für organische und anorganische Phosphate (194, 196). Die klonierten Gene phoE (191) und ompF (190) zeigen über Hybridisierung starke Homologien, die sich über die gesamten Gene erstrecken. Die von der Nukleotidsequenz abgeleitete Primärstruktur des PhoE-Proteins (147) zeigt im Vergleich mit der Aminosäuresequenz des OmpF-Proteins (28, 30) 70 % Homologie (147). Diese ausgeprägte Homologie läßt stark vermuten, daß die Proteine von einem gemeinsamen früheren Gen herstammen und die Struktur während der Evolution gut konserviert blieb (150).

Die äußere Membran ist weniger komplex als die Cytoplasmamembran, da die Zelle nur eine kleine Anzahl von Proteinspezies konstitutiv exprimiert, die anders als die induzierbaren Hauptproteine ständig in großen Mengen in der äußeren Membran als Hauptmembranproteine vorliegen. Es handelt sich bei ihnen um das Lipoprotein, die Proteine OmpA, OmpF, OmpC und das Protein III (105,192).

Das zuerst isolierte Protein dieser Gruppe ist das Lipoprotein (19), das mit ungefähr 10^6 Molekülen pro Zelle anteilmäßig häufigste Protein der Zelle (21). Es kommt in einer mit dem Murein kovalent verknüpften Form und in einer

freien Form vor (19,88). Mutanten, denen das Lipoprotein fehlt, zeigen eine verstärkte EDTA-Sensitivität und Verlust von periplasmatischen Enzymen, was den Schluß nahelegt, daß dem Lipoprotein eine stabilisierende Aufgabe in der äußeren Membran zukommt (78,184). Die Struktur der Lipoprotein m-RNA und des lpp-Gens wurden in den vergangenen Jahren intensiv untersucht (49,87,144). Vergleichende DNA-Sequenzstudien zeigen, daß das Lipoprotein in der Gruppe der Enterobacteriaceae in hohem Maße konserviert ist (134). Ganz unbekannt ist noch die Funktion des Protein III (60,107). Es liegt mit 10^4 - 10^5 Kopien pro Zelle vor (76). Man konnte bisher weder das Strukturgen noch irgendeine Funktion des Proteins ausmachen, da bisher keine Mutanten gefunden werden konnten, denen das Protein fehlt. Seine Synthese ist eventuell auf der Stufe der Transcription über c-AMP und c-AMP-Rezeptorprotein negativ kontrolliert (107). Eine andere Erklärung ist die Regulation der OmpF-Synthese über c-AMP und damit die Änderung des Protein III- und OmpC-Gehaltes als Antwort auf den veränderten OmpF-Gehalt (170).

Die beiden mit dem Murein assoziierten Proteine OmpF und OmpC aus E. coli K12 (104,165) werden von verschiedenen aber strukturell sehr homologen Genen codiert (104,196). Das größere OmpF-Protein ist dem kleineren OmpC sehr ähnlich (148). Die OmpF- und OmpC-Proteine bilden als Trimere Poren in der äußeren Membran, weshalb sie auch als Porine bezeichnet werden. Sie erlauben eine unspezifische Diffusion für verschiedenartige Substanzen bis zu einer Ausschlußgrenze von $M_r \approx 600$ (127,128). Sie zeigen mit dem PhoE-Protein aus E. coli K12 (149) immunologische Kreuzreaktion (148).

Das OmpA-Protein ist ebenfalls ein Hauptmembranprotein von E. coli und kommt zu ungefähr 3×10^5 Kopien pro Zelle vor (60). Es zeigt keine Homologie zu dem OmpF-Protein (29) und ist durch eine Reihe anderer Eigenschaften charakterisiert. Es ist ein hitzemodifizierbares Protein. Das heißt, daß sein über ein SDS-Polyacrylamidgel bestimmtes Molekulargewicht nach Kochen bei 100°C in SDS höher erscheint

(M_r ≈ 33 000) als in der nicht voll denaturierten Form nach Lösen in SDS bei 50°C (M_r ≈ 28 000) (60,156,166). Anhand der von Chen et al. bestimmten Aminosäuresequenz (31) des OmpA-Proteins wurde sein Molekulargewicht zu 35 159 errechnet. Die Hitzemodifizierbarkeit ist daher sehr wahrscheinlich auf eine unvollständige Auffaltung der Polypeptidkette unter entsprechenden Lösungsbedingungen zurückzuführen (29). Die hohe elektrophoretische Beweglichkeit der nicht modofizierten Form wird dem hohen ß-Strukturanteil des Proteins zugeschrieben (29,71).

Das Protein ist in situ empfindlich gegen Proteasen (169). Behandelt man isolierte Zellhüllen mit Trypsin oder Pronase, bleiben NH_2-terminale Proteinfragmente von 24 000 Nach Trypsinverdau und 19 000 nach Pronaseverdau in der Membran zurück. Das Protein ist nicht spaltbar, wenn man ganze Zellen der Protease-Behandlung unterzieht. Das CO_2H-terminale Ende des Proteins ist daher auf der Innenseite für die Protease zugänglich und muß ins Periplasma ragen. Die Pronasespaltstelle liegt bei Aminosäureposition 177 (29).

Mit diesen Daten konnte man folgendes Membranmodell aufstellen (24). Danach besteht das Protein aus zwei Domänen, dem 177 Reste langen NH_2-terminalen Bereich, von dem Teile auf der Oberfläche der Membran und Teile transmembran angeordnet sein müssen, und dem CO_2H-terminalen Bereich, der ins Periplasma reichen muß. Eine neuere Arbeit von Cole et al. (37) lieferte weitere Informationen. Es wird eine OmpA-Mutante beschrieben, die bei Position 72 eine zweite, von der Außenseite der Membran zugängliche Pronasespaltstelle besitzt. Damit war eine bessere Lokalisierung des Transmembranteils zwischen Position 72 und 177 möglich.

Weiter ist es gelungen zu zeigen, daß weniger als 193, aber mehr als 133 Aminosäurereste nötig sind, daß in vivo das Protein in die äußere Membran eingelagert werden kann (23, 24,125). Alle bekannten biologischen Funktionen des OmpA-Proteins sind mit den 193 NH_2-terminalen Aminosäureresten assoziiert.

Das OmpA-Protein aus E. coli K12 ist Rezeptor für eine Reihe von Phagen, wie TuII* (74), K3 (172) und Ox2 (94), was gleichzeitig seinen transmembranen Charakter bestätigt. Es spielt auch eine Rolle bei der Wirkung von Colicin L (26, 55) und Colicin K (45) auf die Zelle. Es stellt aber nicht den eigentlichen Rezeptor für diese Colicine dar. Es muß in irgendeiner Weise den Durchtritt des Colicins durch die äußere Membran ermöglichen (56). Für das OmpA aus Salmonella typhimurium (57) konnte gezeigt werden, daß es Rezeptor für das Bacteriocin 4-59 (182) aus Salmonella ist.

Neben diesen Eigenschaften ist das OmpA-Protein bei der durch F-Pili vermittelten Konjugation auf der Empfängerseite zur Ausbildung stabiler Zellaggregate von Bedeutung, denn OmpA-Mutanten, die kein OmpA mehr ausbilden, sind als Empfänger fast steril (2,68,168,172,195). Dafür, wie auch für seine Eigenschaft als Phagenrezeptor, ist seine Wechselwirkung mit dem LPS essentiell (3,169). Wahrscheinlich beruht das auf einer Beeinflussung der OmpA-Tertiärstruktur durch das LPS. Seine Wechselwirkung mit dem LPS ist sicher auch für die Erhaltung der Zellmorphologie und der Membranstabilität mit von Bedeutung (176). Porencharakter, wie für OmpF und OmpC beschrieben, konnte für das OmpA nicht nachgewiesen werden (91,139).

Das ompA-Strukturgen ist bei 21,5 min auf der E. coli K12 Chromosomenkarte lokalisiert (73,74a). Wie die m-RNA von anderen Hauptmembranproteinen, hat auch die ompA-mRNA eine ziemlich lange Halbwertszeit (58,102) und trägt so zu der hohen Syntheserate des Proteins bei.

Trägt eine Zelle 3 - 5 ompA-Genkopien, führt das zur Überproduktion des Proteins (73). Gleichzeitig wurde gezeigt, daß Mehrproduktion von OmpA-Protein die Abnahme von OmpF- und OmpC-Protein bewirkt (73). Die Klonierung auf ein Plasmid mit hoher Kopienzahl ist dagegen nicht gelungen, da starke Überproduktion für die Zelle lethal ist (23,73).

Ein dem E. coli OmpA entsprechendes Protein wurde auch in anderen Gram-negativen Bakterien beschrieben. Einige die-

ser OmpA-Spezies zeigen immunologische Kreuzreaktionen mit dem E. coli OmpA. Dazu gehören die OmpA-Proteine von Shigella, Enterobacter und sogar das OmpA-Protein von Serratia marcescens, das phylogenetisch von E. coli sehr weit entfernt steht (9).

Aufgabenstellung

Das Ziel dieser Arbeit war es, die Nukleotidsequenzen der ompA-Gene von Shigella dysenteriae, Enterobacter aerogenes und Serratia marcescens zu bestimmen, mit der Absicht, vergleichende Analysen der homologen Systeme auf DNA-Ebene anzustellen.

Die von den Nukleotidsequenzen abgeleiteten Aminosäuresequenzen und damit die Primärstruktur der OmpA-Proteine sollten untereinander und mit dem OmpA-Protein von E. coli verglichen werden und die evolutionäre Entwicklung der OmpA-Proteine innerhalb dieser Bakteriengruppe verdeutlichen. Die Hoffnung war, unterschiedliche Eigenschaften der Proteine mit Unterschieden auf molekularer Ebene korrelieren und homolog gebliebene Bereiche, die keine evolutionären Änderungen der Proteine erlaubten, erkennen zu können.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1. Escherichia coli K12 Stämme und Bakteriophagen

In Tabelle 1 sind die Bakterienstämme aufgelistet, die in dieser Arbeit verwendet wurden. Die genetische Nomenklatur richtet sich nach Bachmann et al. (7).

Tabelle 1: Bakterienstämme

Stamm	Genotyp	Herkunft (Ref.)
Shigella dysenteriae		J.R. Guest
Enterobacter aerogenes		A.A. Hancock
Serratia marcescens		ATCC 13880
E. coli 5K	F^-, hsdR, supE	N.E. Murray
E. coli SNO1	F^-- pyrB, leu, thr, recA, rpsL	S. Normark (141)
E. coli JM103	Δ(lac, pro), thi, strA, endA, sbcB15, hsdR4, supE, F' traD36, $proAB^+$, $lacI^q$, lacz ΔM15, (r^-m^+)	J. Messing (119)
E. coli W620		D.B. Datta (43)
UH99	thi, pyrD, gltA, galK, str, trp, recA	U. Henning
UH100	wie UH99 aber ompA	"
UH101	wie UH100 aber lac	"
UH302	thi, argE, proA, thr, leu, ute, xyl, arg, galK, lacY, str, supE	"
P460	thi, thr, leu, argE, proA, str, xyl, ara, galK, lacY, supE, ompA	"
JC5484	$F'lac^+$/his, trp, lac, tonA, tsx	M. Achtman (3)

UH302 ist phänotypisch ompA$^-$, ompC$^-$, ompF$^-$, aber genotypisch nicht näher charakterisiert.

Die verwendeten OmpA-spezifischen Phagen waren Ox2 (94), Wirtsbereichsmutanten von Ox2, die von R. Morona isoliert (unveröffentlichte Daten) und zur Verfügung gestellt wurden, TuII*, K3 und verschiedene Wirtsbereichsmutanten von K3 (42,72,74,110,172).

2.2. Phagen und Plasmide als Klonierungsvektoren

In dieser Arbeit wurde der Phage λNM 816 (202) als Vektor benutzt. Dieser Phage ist ein Klonierungsvektor für EcoRI-Fragmente. Abkömmlinge von λNM816 waren λompA-Sh, λompA-En und λompA-Se. Sie trugen je ein EcoRI-Fragment mit dem jeweiligen ompA-Gen aus Shigella dysenteriae, Enterobacter aerogenes und Serratia marcescens (38).

Die replikativen Formen der Phagen-DNA's von M13mp8 und M13mp9 (117,118) dienten als Vektoren zum "shot-gun" Klonieren von ompA-Genfragmenten.

Als Klonierungsvektoren wurden die in Tabelle 2 aufgeführten Plasmide verwendet.

Tabelle 2: Charakterisierung der Plasmide

Plasmid	Charakterisierung und Referenzangaben	
pBR 322	4.362 Kb Tet^r, Amp^r	(16,183)
pACYC 184	3.97 Kb Cm^r, Tet^r	(27)
pHSG 415	7.1 Kb Amp^r, Cm^r, Km^r	(67)
pTU 100	7.5 Kb ompA-Genfragment aus E. coli in pSC 101	(73)
pTU 301	1.83 Kb BamHI-Fragment mit dem 3'-Terminus des ompA-Gens aus E. coli in pBR 322	(65)
pTU 3Sh	2.3 Kb BamHI-HindIII-Fragment mit 5'-Terminus des ompA-Gens aus S. dys. in pHSG 415	(18)
pTU 4Sh	1.08 Kb HincII-Fragment aus S. dys. in pACYC 184	(18)
pTU 1Sh	2.3 Kb BamHI-EcoRI-Fragment mit dem 3'-Terminus des ompA-Gens von S. dys.	(18)
pTU 5Se	7.4 Kb EcoRI Fragment mit ompA-Gen aus S. marc. in pHSG 415	
pTU 6Se	1.55 Kb BamHI-Fragment mit dem 3'-Terminus des ompA-Gens aus S. marc. in pBR 322	
pTU 7En	7.4 Kb EcoRI-Fragment mit ompA-Gen aus E. aer. in pHSG 415	

2.3. Medien und Lösungen

LB-Medium	pro 1
Bacto Trypton	10 g
Bacto Yeast Extrakt	5 g
NaCl	5 g

YT-Medium	pro 1
Bacto Trypton	8 g
Bacto Yeast Extrakt	5 g
NaCl	5 g

Minimal-Medium	pro 1
K_2HPO_4	10,5 g
KH_2PO_4	4,5 g
$(NH_4)_2SO_4$	1 g
Natriumcitrat-$2H_2O$	0,5 g
$MgSO_4$-$7H_2O$	0,2 g
Thiamin	5 µg
Glucose	2 g

Festmedien enthielten 1,5 % Agar bzw. 0,75 % Agar für Top-Medium.

Zusätze für Medien

X-Gal wurde 2 %ig in Dimethylformamid angesetzt (1,25 mg/ml). IPTG wurde zu 100 mM in H_2O angesetzt.
Antibiotika wie Ampicillin, Tetracyclin, Spectinomycin und Kanamycin wurden jeweils frisch angesetzt und in den gewünschten Konzentrationen dem sterilen Medium zugesetzt. Chloramphenicol wurde als Stammlösung zu 100 mg/ml in Methanol bei $4^{\circ}C$ gelagert.

Phagenpuffer

$MgCl_2$	10 mM
Tris	10 mM
NaCl	10 mM

Dieser Puffer wurde mit HCl (konc.) auf pH 7,9 eingestellt.

100 x TE-Puffer

Tris-HCl pH 7,5	1 M
Na_2EDTA	0,1 M

TES-Puffer

Tris-HCl pH 7,5	10 mM
NaCl	50 mM
Na_2EDTA	1 mM

Pronasepuffer

Tris-HCl pH 7,5	20 mM
NaCl	0,1 mM
Na_2EDTA	1 mM
Triton-X-100	0,002 %

DNase-Verdünnungspuffer

KH_2PO_4/K_2HPO_4 pH 7	10 mM
NaCl	200 mM
EDTA	1 mM
β-Mercaptoäthanol	0,7 mM
BSA	2 mg/ml
Triton-X-100	0,2 %

10 x Elektrophoresepuffer als Puffer für Agarosegele

	pro 5 l
Tris	242 g
Essigsäure (96 %)	57,1 ml
Na_2EDTA	37,2 g

25 x SSC

NaCl	3,75 M
Na-Citrat	0,375 M

10 x TBE-Puffer pro 1

Tris	108 g
Borsäure	55 g
Na_2EDTA	8,3 g

pH-Wert liegt uneingestellt bei 8,3

50 x Denhardt-Lösung

Polyvinylpyrrolidon	1 %
Ficoll 400	1 %
BSA	1 %

Phenol

Phenol wurde bei 160°C destilliert, mit 10 mM Tris-HCl pH 7,8, 0,1 mM Na_2EDTA gesättigt und bei -20°C unter Stickstoff gelagert.

Formamid

Das Formamid wurde vor Gebrauch mit Bio-Rad AG 50W-X8 deionisiert. Dazu wurden 5 g des Ionenaustauschers zu 100 ml Formamid gegeben und 30 min zusammen gerührt. Das Formamid wurde abgefiltert.

Lösungen für Acrylamidgele

Acrylamid wurde in destilliertem H_2O gelöst. Für Acrylamidgele zur Trennung und Isolierung von DNA-Fragmenten wurde es 25 %ig im Verhältnis 30:1 mit Bisacrylamid angesetzt.

Für diese Gele wurde folgendes Rezept benutzt:

	5 %	3,5 %
25 % Acrylamid-Bis-acrylamid (30:1)	12 ml	10 ml
10 x TBE	3 ml	3,6 ml
H_2O dest.	45 ml	58 ml
10 % Ammoniumperoxo-disulfat	400 µl	400 µl
TEMED	25 µl	25 µl

Sequenzgele wurden mit den folgenden Lösungen hergestellt:

	40 cm-Gel				100 cm-Gel
	5 %	6 %	8 %	20 %	6 %
40 % Acrylamid-Bisacrylamid (19:1)	7,5 ml	9 ml	12 ml	30 ml	36 ml++
Harnstoff	30 g	30 g	30 g	30 g	90 g
H_2O dest.	23 ml	21,5 ml	18,5 ml	0,5 ml	55,5 ml
TBE-Puffer	6 ml	6 ml	6 ml	6 ml	18 ml
10 % Ammonium-peroxo-disulfat	420 µl	420 µl	420 µl	420 µl	1,26 ml
TEMED	20 µl	20 µl	20 µl	20 µl	25 µl

++30 % Acrylamid-Bisacrylamid (30:1)

Die Gellösungen wurden vor dem Ausgießen entgast.

Lösungen für die DNA-Sequenzierung nach Maxam und Gilbert

Kakodylat-Mix
- 50 mM Natrium-Kakodylat (pH 8,0)
- 10 mM $MgCl_2$
- 1 mM Na_2EDTA

DMS-Stopp-Mix
- 1,0 M Tris-Acetat (pH 7,5)
- 1,0 M Mercaptoäthanol
- 1,5 M Na-Acetat
- 50 mM Mg-Acetat
- 1 mM EDTA
- 0,4 mg/ml Hefe t-RNA

Hydrazin-Stopp-Mix 300 mM Na-Acetat
0,1 mM Na_2EDTA
0,1 mg/ml Hefe t-RNA

Lösungen für die DNA-Sequenzierung nach Sanger

Desoxynukleotide und Didesoxynukleotide wurden in H_2O dest. angesetzt. Die Stammlösungen waren für die Desoxynukleotide 20 mM und für die Didesoxynukleotide 10 mM. Sie wurden bei -20°C gelagert. Für die Sequenzreaktionen wurden die vier Mixe spezifisch für Guanin, Cytosin, Thymin und Adenin nach folgendem Pipettierschema hergestellt:

Nukleotid-Mixe		T-Mix	C-Mix	G-Mix	A-Mix
dTTP	0,5 mM	5	100	100	100
dCTP	0,5 mM	100	5	100	100
dGTP	0,5 mM	100	100	5	100
ddTTP	10 mM	5			
ddCTP	10 mM		1		
ddGTP	10 mM			1,5	
ddATP	5 mM				1
Tris-HCl pH 8	10 mM	200	200	200	100

Diese Mixe wurden in 30 µl Portionen abgepackt und bei -20°C gelagert.
Der Chase-Mix enthielt alle Desoxynukleotide zu 250 µM.

Reaktionsmix für 9 Klone (d.h. 36 Reaktionen)

^{32}P-dATP	800 Ci/mmol 10 µCi/µl	12 µl
DNA-Polymerase I (Klenow-Fragment)	5 U/µl	2,3 µl
H_2O		60 µl

2.4. Chemikalien

Sofern nicht besonders aufgeführt, wurden analysenreine Chemikalien der Firma Merck, Darmstadt, verwendet.

Aldrich-Europe, Belgien	Dimethylsulfoxid
Bayer AG, Leverkusen	Ampicillin
Biolabs	T4-Ligase 15 bp Primer
Biorad, Richmond, Calif.	Agarose Standard Low M_r Ionenaustauscher AG 50W-X8
Boehringer, Mannheim GmbH	Alkalische Phosphatase Lysozym (aus Hühnereiweiß) RNase (aus Rinderpankreas) T4 Polynukleotidkinase Polymerase I aus E. coli, Klenow-Fragment Tetracyclin Desoxynukleotide Didesoxynukleotide
Calbiochem, San Diego	Dithiothreitol
Canalco, Bethesda, USA	Brom-Phenol-Blau
Difco Laboratories, Detroit	Bacto Trypton Yeast-Extrakt Agar
DuPont, Wilmington, USA	Röntgenfilm Cronex-4/NIF100 Verstärkerfolie Cronex Quanta III
Fluka AG	Acrylamid
Eastman-Kodak, Rochester, USA	Hydrazin
New England Nuclear	α^{32}P-dATP γ^{32}P-dATP

Pharmacia Fine Chemicals AB	Sephadex G-100 Ficoll Dextransulfat 500
Roth, Karlsruhe	Silicon-Antischaumemulsion
Sartorius	Nitrocellulose-Membranfilter 15F Typ SM 41
Serva, Heidelberg	Chloramphenicol Äthylendiamintetraessigsäure Ethidiumbromid DNase Triton-X-100 Kalbsthymus-DNA SDS Polyäthylenglykol 600 Visking-Dialyseschläuche
Sigma	Rinderserumalbumin 5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-β-D-Galactoside Isopropyl-thiogalactosid Polyvinylpyrrolidon
Schwarz/Mann, Orangeburg	Sucrose
Whatman Ltd., England	DEAE 52 - Cellulose

2.5. Mikrobiologische Methoden

2.5.1. Kulturbedingungen für Bakterien

Bakterienkulturen auf Agarplatten mit entsprechendem Festmedium (normalerweise LB-Medium, für JM103 Minimalmedium) dienten als Ausgangsmaterial für Flüssigkulturen. Die Anzucht erfolgte in LB-Medium, für JM103 in YT-, oder 2xYT-Medium für die Produktion von M13-Phagen auf JM103 in Schüttelkultur bei 37°C (bei 30°C für Stämme, die das Plasmid

pHSG 415 trugen), bis die gewünschte Zelldichte erreicht war. Die Anzucht größerer Bakterienkulturen (500 ml - 750 ml) erfolgte in 1 l Belüftungsflaschen. Dem Medium wurden einige Tropfen Silicon-Antischaumemulsion zugesetzt. Trugen die Bakterien Plasmide mit Antibiotikaresistenzgenen, wurden den Medien die entsprechenden Antibiotika zugesetzt: Ampicillin 20 µg/ml, Tetracyclin 20 µg/ml, Chloramphenicol 20 µg/ml.

2.5.2. Bakterielle Konjugation

Bakterienstämme (lac^- str^r), die als Empfänger bei der Konjugation getestet werden sollten, wurden in 5 ml LB-Medium bis zur stationären Phase angezogen.

Um das dem Medium zugesetzte Antibiotikum zu entfernen, wurden die Zellen zweimal mit 5 ml LB-Medium gewaschen und wieder in 5 ml LB-Medium resuspendiert. Der F'lac^+-Donor-Stamm JC5484 (lac^-str^s) wurde ohne Schütteln angezüchtet, bis er eine OD_{650} von 0,4 erreicht hatte. Für die Konjugation wurde 1 ml Empfänger und 0,5 ml des Donorstammes 30 min zusammen bei 37°C ohne Schütteln inkubiert. Verdünnungen dieses Ansatzes (10^{-1} - 10^{-6}) wurden auf McConkey Lactose Agar mit 150 µg Streptomycin/ml ausplattiert.

Nach 12 h bei 37°C wurde die Zahl der lac^+ (rot) und der lac^- (weiß) Kolonien bestimmt.

2.5.3. Test auf Phagenempfindlichkeit

Um die Phagenempfindlichkeit eines Teststammes zu ermitteln, wurden Zellen aus einer Flüssigkultur in einem Strich auf einer LB-Platte ausgezogen. Danach wurde ein Tropfen eines hochtitrigen Phagenlysats aufgetropft. Inkubiert wurde für 6 - 8 h. Entstehende Zellysehöfe deutete die Phagenempfindlichkeit des Teststammes an.

2.5.4. Test auf Phagenbindung

Zellen einer Übernachtkultur des zu testenden Stammes wurden mit $CHCl_3$ abgetötet. 0,2 ml dieser Zellen wurden mit 0,8 ml LB-Medium auf 1 ml aufgefüllt und mit 1 ml des zu testenden Phagen-Lysats (10^4/ml) gemischt. In Abständen von 4 min wurde je 0,2 ml entnommen und in kaltem LB-Medium 1:10 verdünnt. Mit diesen Proben wurde eine Titerbestimmung durchgeführt.

Eine irreversible Bindung der Phagen an die Bakterienoberfläche zeigte sich durch die Abnahme des Titers mit der Zeit. War keine Abnahme zu sehen, gab es die Möglichkeit einer reversiblen Bindung des Phagen, was mit einem Konkurrenz-Experiment zwischen Test- und Wildtypstamm zu prüfen war. Wurde die Inaktivierung des Wildtyp-Stammes durch einen 5-fachen Überschuß des Teststammes verlangsamt, ließ dies auf eine reversible Bindung der Bakteriophagen an den Teststamm schließen. Abwesenheit eines solchen Einflusses zeigte, daß der Phage nicht an die Zellen binden konnte.

2.5.5. Test auf Empfindlichkeit gegenüber Bacteriocinen

Dazu wurden 0,1 ml einer Übernachtkultur des Teststammes zusammen mit 2,5 ml LB - Oberagar auf eine LB - Platte ausgegossen. Um gleichzeitig das Ausmaß der Empfindlichkeit zu bestimmen, wurden verschiedene Verdünnungen der nach der Methode von Foulds (60) hergestellten Bacteriocinpräparate benutzt. Von diesen Verdünnungen wurden jeweils gleiche Mengen aufgetropft. Klare Höfe im Bakterienrasen an der Auftropfstelle zeigte, bis zu welchem Grad die Empfindlichkeit des Teststammes reichte.

Die Bacteriocinpräparate wurden von Frau M. Maldener zur Verfügung gestellt.

2.5.6. Transformation von Bakterien und Transfektion mit λ-Phagen-DNA

Die Transformation wurde nach der Methode von Cohen et al. in modifizierter Form durchgeführt (33). Zellen wurden bis zur frühen logarithmischen Wachstumsphase (OD_{650} von 0,55 - 0,65) angezüchtet, danach bei 4°C abzentrifugiert und in 1/2 Vol. eiskaltem 0,1 M sterilem $CaCl_2$ resuspendiert und sofort wieder abzentrifugiert. In 1/20 Vol. 0,1 M $CaCl_2$ wurden die Zellen für 90 min auf Eis inkubiert. Die zu transformierende DNA (1 µg auf Vektor bezogen) wurde auf 0,1 ml (in 1 x SSC, 0,1 M $CaCl_2$ 3:4) verdünnt und zu 0,2 ml kompetenten Zellen gegeben. Rezipienten und DNA wurden für 30 min auf Eis gestellt und danach für 2 min bei 42°C inkubiert. Nach dem Hitzeschock wurden die Zellen in 1 ml LB-Medium aufgenommen und für 1 h bei 37°C geschüttelt. Verdünnungen dieses Transformationsansatzes wurden auf Platten ausgestrichen.

Bei einer Transfektion konnten die Zellen sofort nach dem Hitzeschock in Verdünnungen zusammen mit 0,1 ml Indikatorbakterien aus einer Übernachtkultur im Ober-Agar auf Platten ausgegossen werden.

2.5.7. Transfektion von JM103 mit rekombinanter M13mp8- und M13mp9-Phagen-DNA

JM103-Zellen wurden in YT-Medium bis zu OD_{650} von 0,55 - 0,65 wachsen gelassen, abzentrifugiert und in 1/2 Vol. 50 mM $CaCl_2$ resuspendiert. Nach 20 min auf Eis wurden sie ein zweites Mal abzentrifugiert und in 1/10 Vol. 50 mM $CaCl_2$ aufgenommen. Je 0,3 ml der kompetenten Zellen wurden zusammen mit der rekombinanten DNA für 40 min auf Eis gestellt und danach bei 42°C 2 min geschockt. Zum Ausplattieren wurden direkt zu den Zellen 0,1 ml einer JM103 Übernachtkultur, 3 ml YT-Ober-Agar, 10 µl 100 mM IPTG und 50 µl 2 % X-Gal zupipettiert und auf YT-Agar-Platten ausgegossen.

Die Vektor-DNA-Berechnungen pro Platte erfolgten erfahrungsgemäß. Für eine Transfektion mit DNA nach "sticky-end" Donor-Vektor-DNA-Ligierung wurden 1 - 3 ng Vektor-DNA pro Platte benutzt. Nach Rekombination mit "flush ends" wurden bis zu 5 ng Vektor-DNA pro Platte genommen.

2.5.8. Vermehrung von λ-Phagen

Bei den λ-Phagen handelte es sich immer um den EcoRI-Vektor λNM 816 (202) mit jeweils verschiedenen Insertionen.

2.5.8.1. Plattenlysat

Ein frischer Plaque wurde mit einer sterilen Pasteur-Pipette in 1 ml Phagenpuffer (+ 1 Tropfen $CHCl_3$) überführt. Diese Phagensuspension mit ungefähr 10^5 - 5 x 10^7 Phagen wurde zusammen mit 0,05 ml Indikatorbakterien einer Übernachtkultur in 2,5 ml LB-Oberagar mit 10 mM Mg^{2+} auf frische LB-Platten in den Verdünnungen ausgegossen, so daß ungefähr 10^5 Plaques pro Platte zu erwarten waren. Die Plaquebildung erfolgte innerhalb 6 h bei 37°C. Mit 2 ml über den Oberagar ausgebreitetem LB-Medium konnten die Phagen zusammen mit dem Oberagar abgenommen werden. Nach gutem Vortexen wurde der Agar abzentrifugiert und der Phagentiter bestimmt. Die Phagen dienten zur weiteren Vermehrung über Infektion in flüssigem Medium (Kap. 2.5.8.2.).

2.5.8.2. Infektion mit λ-Phagen in flüssigem Medium

Für eine Phagen-Infektion wurden die Bakterien bis zu OD_{650} 0,45 - 0,65 hochgezogen. Zur Gewinnung der replikativen DNA-Form von M13 Phagen wurden JM103 Wirtszellen mit 15-20-fachem Überschuß mit M13 Phagen infiziert und für 3 h weiterinkubiert. Zur Aufarbeitung der replikativen Form von M13 aus Zellysaten siehe Kap. 2.6.2.2.

Zur λ-Phagenvermehrung wurden E. coli 5K-Zellen mit einer Multiplizität von 1 infiziert und bis zur Zellyse weiterinkubiert. Die Phagengewinnung aus dem Überstand ist in Kap. 2.6.1.1. beschrieben.

2.5.8.3. Induktion des λ-Prophagen

Induktion des Prophagen λNM 816 kann durch kurzzeitiges Erwärmen auf 42°C erreicht werden, da λNM 816 einen thermosensitiven Repressor trägt (202). Die Anzucht von λNM 816 lysogenen E. coli 5K-Zellen erfolgte in Belüftungsflaschen in 500 ml LB-Medium bei einer OD_{650} von 0,45 bei 32°C. Die Prophageninduktion erfolgte bei 42°C, d.h. die Temperatur des Mediums sollte 42°C erreicht haben. Die weitere Inkubation bei 37°C unter starker Belüftung dauerte so lange, bis die Lyse der Zellen einsetzte. Nach der Lyse wurden einige Tropfen $CHCl_3$ zugesetzt, um die Zellen vollständig zu lysieren.
Zelltrümmer wurden im GSA-Rotor 10 min bei 10 000 Upm abzentrifugiert und der Überstand mit je 10 µg/ml DNase und RNase versetzt (1 h bei Raumtemperatur). Phagenfällung erfolgte mit Polyäthylenglykol 6000 (Kap. 2.6.1.1.).

2.5.8.4. Vermehrung von rekombinanten M13-Phagen

Rekombinante M13-Phagen wurden als weiße Plaques auf Medium mit X-Gal als Indikator erkannt. Diese Plaques wurden mit einer sterilen Pasteur-Pipette aus dem Agar ausgestanzt und in 5 ml 2 x YT-Medium mit 20 µl einer nichtinfizierten JM103 Übernachtkultur überführt. Die Phagenvermehrung erfolgte während 5 h bei 37°C bei guter Belüftung.

2 ml der Kultur wurden in einer Eppendorf-Zentrifuge abzentrifugiert. Nur 1,8 ml des Überstandes wurden, um keine Zellen zu übertragen, mit einer Pasteur-Pipette vorsichtig abgenommen und die Phagen darin mit Polyäthylenglykol 6000 gefällt (Kap. 2.6.1.2.).

2.6. Molekularbiologische Methoden

2.6.1. Aufarbeitung von Phagen-DNA

2.6.1.1. Fällung von λ-Phagen mit Polyäthylenglykol 6000, CsCl-Step-Gradient und Extraktion ihrer DNA mit Phenol

Fällung von λ-Phagen mit Polyäthylenglykol 6000 ist eine einfache Methode, Phagen zu konzentrieren (204). Phagen aus klaren Lysaten wurden über Nacht bei 4°C in Gegenwart von 0,5 M NaCl und 10 % Polyäthylenglykol 6000 gefällt. Sie wurden mit 10 000 Upm im GSA-Sorvall-Rotor abzentrifugiert, in Phagenpuffer resuspendiert und über einen CsCl-Stufengradient weiter konzentriert und gereinigt. Zentrifugiert wurde in einem SW 41 Ti-Beckmann-Rotor 2 h mit 35 000 Upm bei 20°C. Der Gradient wurde mit 1,5 ml einer 54 % (w/w), 1,5 ml einer 42 % (w/w) und 1,5 ml einer 31 % (w/w) CsCl-Lösung vorbereitet, indem in der aufgeführten Reihenfolge die Lösung mit der größten Dichte zuerst pipet-

tiert wurde, und die anderen Lösungen vorsichtig überschichtet wurden. Die CsCl-Lösungen wurden in Phagenpuffer angesetzt. Das Zentrifugenröhrchen faßte ungefähr 7 ml Phagensuspension, die dem Gradienten überschichtet wurden. Nach der Zentrifugation wurde die Phagenbande abgenommen und die Phagen 2 h gegen TE-Puffer dialysiert. Danach wurden die Phagen mit Pronase in der Endkonzentration 1 mg/ml 1 h bei 37°C inkubiert und 2 h gegen Pronasepuffer dialysiert. Die Extraktion der Phagen-DNA erfolgte über Phenolextraktion (39).

2.6.1.2. Fällung von M13-Phagen und Extraktion von M13-Phagen-DNA für die DNA-Sequenzierung nach Sanger

M13-Phagen wurden aus 1,8 ml Mediumüberstand nach Abzentrifugieren ihrer JM103-Wirtszellen gefällt. 270 µl einer kurz vor Gebrauch angesetzten Mischung von 2,5 M NaCl und 20 % Polyäthylenglykol 6000 fällte die Phagen während 30 min bei Raumtemperatur. Die M13-Phagen wurden 5 min in einer Eppendorf-Zentrifuge abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Es wurde nochmals kurz zentrifugiert, um alle restlichen Spuren von Medium und Polyäthylenglykol 6000 mit einer Pasteur-Pipette abnehmen zu können.

Der Phagenniederschlag wurde in 150 µl 10 mM Tris-HCl pH 7,8, 0,1 mM Na_2EDTA gut resuspendiert und je einmal mit dem gleichen Volumen Phenol, Phenol:$CHCl_3$ (gemischt mit Isoamylalkohol, 24:1) und $CHCl_3$ extrahiert (108).

Die Fällung (Cortese, pers. Mitteilung) der isolierten Einzelstrang-DNA aus 100 µl Extrakt erfolgte mit 20 µl 5 M Natriumperchlorat und 50 µl Isopropanol und Zentrifugation des Gemisches für 15 min bei Raumtemperatur mit 12 000 g. Die gefällte DNA wurde in 100 µl 0,3 M NaAc resuspendiert und mit 300 µl Äthanol für 15 min bei Raumtemperatur noch einmal gefällt. Der Niederschlag wurde mit 1 ml Äthanol gewaschen, getrocknet und in 30 µl 10 mM Tris-HCl pH 7,8,

0,1 mM Na_2EDTA resuspendiert. Diese DNA wurde für die DNA-Sequenzreaktionen nach Sanger (162) benützt (Kap. 2.6.13.).

2.6.2. Isolierung und Reinigung von Plasmid-DNA

2.6.2.1. Minipräparation von Plasmid-DNA

Die Präparation von Plasmiden hoher Kopienzahl erfolgte nach der Vorschrift von Horowicz und Burke (89). Analytische Restriktionsverdaus von Plasmiden aus diesen Minilysaten erfolgte wie unter Kap. 2.6.5.1. beschrieben. Nach einem anschließenden zwei Minuten-Verdau der bei der Minilysataufarbeitung mitisolierten RNA mit RNase waren auch kleinere Restriktionsfragmente auf dem Agarosegel sichtbar. Zu diesem Zweck wurde die RNase vorher 15 min gekocht und in einer Endkonzentration von 2 µg/10 µl eingesetzt. Die Minipräparation von pHSG 415, einem Plasmid mit niedriger Kopienzahl, erfolgte in Abwandlung. Lysiert wurden 4 ml Kultur mit jeweils 4-fachen Mengen der Lösungen für die Minilysatpräparation. Lösung I enthielt, wie bei Birnboim und Doly beschrieben (14), Lysozym. Die DNA-Ausbeute von pHSG 415 reichte für zwei Restriktionsverdauungen.

2.6.2.2. Präparative Aufarbeitung von Plasmid-DNA: Alkalische Extraktion und CsCl-Ethidiumbromid-Dichtegradienten-Zentrifugation

Plasmid-DNA von pBR 322 und pACYC 184 und deren Derivaten wurden aus amplifizierten Kulturen und deren klaren Lysaten (55) gewonnen und über 2 CsCl-Gradienten gereinigt und konzentriert. pHSG 415 wurde aus klaren Lysaten mit Polyäthylenglykol 6000 gefällt (84), in TES-Puffer resuspendiert und ebenfalls über einen CsCl-Gradienten weiter gereinigt.

Die pBR 322 und pACYC 184 tragenden Stämme wurden in Belüftungsflaschen in 750 ml LB-Medium bis zu einer OD_{650} von 0,45 angezüchtet. pBR 322 wurde durch Zugabe von 200 µg/ml Chloramphenicol amplifiziert (50).

pACYC 184-Amplifikation erfolgte mit Spectinomycin (300 µg/ml) (27). Zur Amplifikation wurden die Zellen über Nacht bei 37°C weiterinkubiert. Die Zellen wurden dann 10 min bei 10 000 Upm in einem GSA-Sorvall-Rotor zentrifugiert und in 8 ml 25 % (w/v) Sucrose, 50 mM Tris/HCl pH 7,8 resuspendiert und auf Eis gestellt. 1,6 ml einer Lysozymlösung (10 mg/ml in Tris/HCl pH 7,8) wurde 5 min auf die Zellen einwirken gelassen. Danach wurde für weitere 5 min zusammen mit 1,6 ml 0,25 M Na_2EDTA pH 8 inkubiert. Mit 6,4 ml eines Triton-Lysis-Mixes (2 % Triton-X-100, 60 mM Na_2EDTA, 50 mM Tris/HCl pH 8) erfolgte während 20 min auf Eis vorsichtige Zellyse.

Das zähe Lysat wurde bei 26 000 g (20 000 Upm im SS34 Sorvall-Rotor) für 30 bis 60 min zentrifugiert. Pro 4 ml des Überstandes wurden 4,1 g CsCl zugewogen und mit 0,5 ml einer 10 mg/ml Ethidiumbromidlösung versetzt. Zentrifugiert wurde für 6 - 7 h bei 52 000 Upm bei 15°C im Vertikalrotor TV 865. Häufig wurde ein zweiter Gradient gefahren. Ethidiumbromidextraktion erfolgte mit CsCl gesättigtem Isopropanol. Danach wurde gegen TE-Puffer für mindestens 24 h mit mehrmaligem Pufferwechsel dialysiert. Verwendete Dialyseschläuche und deren Vorbehandlung ist in Kapitel 2.6.8. erwähnt.

Das mit niedriger Kopienzahl vorkommende Plasmid pHSG 415 wurde aus 1 l Zellkultur in der stationären Phase gewonnen. Die Zellen wurden geerntet und lysiert wie für pBR 322 und pACYC 184 beschrieben. Eine Abwandlung bestand darin, daß jeweils das doppelte Volumen der Lösungen benutzt wurde. Der Überstand des Lysats wurde 1:1 mit Aqua dest. verdünnt und mit Proteinase K bei 100 µg/ml für 1 h bei 37°C inkubiert. Die Plasmid-DNA wurde mit Polyäthylenglykol 6000 gefällt und zwar wurde eine 30 % Polyäthylenglykol 6000,

1,5 M NaCl-Lösung 1:2 zum Lysatüberstand gegeben (Endkonzenatration Polyäthylenglykol 6000 10% und NaCl 0,5 M) und über Nacht bei 4°C präzipitiert. Eine 5 min Zentrifugation bei 5000 Upm im GSA-Rotor war ausreichend, die DNA zu fällen. Der Niederschlag wurde in wenig TES-Puffer resuspendiert und auf maximal 2 bis 3 Zentrifugenröhrchen für den Vertikalrotor TV 865 verteilt. Die CsCl-Lösung für den Gradienten hatte folgende Zusammensetzung: 40 g CsCl, 26 ml dest. H_2O und 4 ml Ethidiumbromid (10 mg/ml) und hatte die Dichte von 1,399 - 1,4 gr/ml (199). Von dieser Lösung wurde pro Zentrifugenröhrchen 3,45 ml unter die 0,95 ml Proben geschichtet. Die Zentrifugation erfolgte 2 h bei 55 000 Upm bei 15°C.

Die replikative DNA-Form von M13-Phagen wurde aus 1 l infizierter JM103-Zellkultur (Kap. 2.5.8.2.) gewonnen. Zur Zellyse und Aufarbeitung wurden je die 80-fachen Mengen der bei Horowicz und Burke (89) angegebenen Lösungen verwendet. Die replikative Form wurde mit dem gleichen Volumen Äthanol aus dem klaren Überstand gefällt, der Niederschlag in 2 ml TES-Puffer resuspendiert und über den gleichen wie für pHSG 415 angegebenen Gradienten gereinigt.

2.6.3. DNA-Mengenbestimmung

Die Menge gereinigter Plasmid-DNA wurde photometrisch mit einem Zeiss Spektralphotometer (PMQ II) bei Wellenlänge 260 nm bestimmt. Es wurden 1 ml Quarzküvetten mit einer Schichtdicke von 1 cm verwendet. Eine Extinktion von 1 bei 260 nm entspricht einem DNA-Gehalt von 50 µg/ml. Radioaktiv markierte DNA (Kap. 2.6.5.6., Kap. 2.6.5.5.) wurde über die Messung der eingebauten Radioaktivität bestimmt. Die Radioaktivität wurde über die cpm-Zahl nach Cerenkov bestimmt. Gezählt wurde in einem Packard Szintillations-Zähler im ^3H-Kanal.

2.6.4. Nukleinsäurepräzipitation

Wenn nicht ausdrücklich anders erwähnt, wurde DNA mit dem zwei- bis dreifachen Volumen Äthanol aus einer 0,3 M Na-Acetat-, 10 mM $MgCl_2$-Lösung gefällt. Das Gemisch wurde 10 min auf -70°C gestellt und 15 min in einer Eppendorf-Tischzentrifuge zentrifugiert. Die gefällte DNA wurde mit 1 ml Äthanol gewaschen und in einem Exsiccator getrocknet.

2.6.5. Arbeit mit DNA-spezifischen Enzymen

2.6.5.1. Bedingungen für die DNA-Spaltung mit Restriktionsenzymen

Die Pufferbedingungen für Restriktionsverdauungen wurden für alle verwendeten Restriktionsenzyme nach Angaben der Lieferanten (Boehringer Mannheim GmbH, New England Biolabs) gewählt.

Für den Puffer wurde statt 2-Mercaptoäthanol 1 mM Dithiothreitol (DTT) verwendet. 1 µg Plasmid-DNA wurde mit 2 Einheiten Enzym (Definition Enzymeinheit entsprechend den Angaben des Lieferanten) für 1 h bei der erforderlichen Temperatur verdaut. Für präparative Verdauungen größerer DNA-Mengen wurden weniger Enzymeinheiten verwendet und entsprechend länger verdaut. Zum Erstellen von Feinrestriktionskarten wurden partielle Verdauungen nach der Methode von Smith und Birnstiel (175) durchgeführt. Dafür war die DNA einseitig am 5'-Ende mit γ-^{32}P-dATP markiert (siehe Kap. 2.6.5.5.). Für einen Verdau war DNA markiert mit 10 000 cpm (Čerenkov) ausreichend. Als Träger wurde 1 ng Kalbsthymus-DNA zugegeben. Verdaut wurde in 10 µl mit einer Enzymeinheit unter den beschriebenen Pufferbedingungen. Gewöhnlich wurden in 5 min Intervallen 1,5 µl des Verdauungsansatzes herausgenommen und sofort auf -70°C gebracht. Die Zeitproben wurden vereinigt auf ein Gel aufgetragen.

2.6.5.2. Auffüllreaktion für DNA-Fragmente mit überhängendem 5'-Ende

Um DNA-Fragmente mit überhängendem 5'-Ende stumpfendig zu bekommen, wurden die komplementären Nukleotide mit dem Klenow-Fragment der Polymerase I aus E. coli anpolymerisiert. Die Reaktion lief in 10 mM Tris-HCl 7,8, 10 mM $MgCl_2$ unter Zugabe von 1 mM DTT und 200 µM von jedem Desoxynukleotid (dGTP, dCTP, dATP, dTTP) 1 h bei Raumtemperatur.

2.6.5.3. Ligierungen

Für Ligierungen von DNA-Fragmenten in Plasmide wurden Vektor- und Donor-DNA so gewählt, daß das molare Mengenverhältnis ungefähr 1:1 war. Für Ligierungen von DNA-Fragmenten in die replikative DNA-Form des Phagen M13mp8 oder M13mp9 wurde die geschnittene DNA in 3- bis 5-fachem molarem Überschuß zu 10 ng geschnittener Vektor-DNA gegeben. Dieses galt für 'sticky-end'-Ligierungen. Für 'flush-end'-Ligierungen wurden die einzuligierenden DNA-Fragmente in einem bis zu 30-fachen molaren Überschuß zugegeben. Da für Ligierungen sowohl Donor- als auch Vektor-DNA vorher mit entsprechenden Restriktionsenzymen geschnitten wurden, mußten diese Enzyme vor dem Start der Ligierungsreaktion während 15 min bei 70°C inaktiviert werden. Die Ligasereaktion wurde in Ligasepuffer (50 mM Tris/HCl pH 7,6, 10 mM $MgCl_2$, 10 mM DTT, 1 mM ATP) über Nacht bei 10°C durchgeführt.

2.6.5.4. Dephosphorylierungen von DNA-Fragmenten mit alkalischer Phosphatase

Die 5'-Phosphatgruppen von Restriktionsfragmenten wurden mit alkalischer Phosphatase (Boehringer, Mannheim) enzymatisch abgespalten. Die Reaktion erfolgte in 200 µl 100 mM Tris/HCl pH 8 mit 0,1 Einheiten alkalischer Phosphatase. Nach 30 min Inkubationszeit bei 42°C wurde dreimal mit puffergesättigtem Phenol extrahiert und danach dreimal mit 1 ml Äther ausgeschüttelt, um das restliche Phenol zu entfernen. Es folgte eine Äthanol-Fällung (Kap. 2.6.4.) und Trocknen der DNA im Vakuum.

2.6.5.5. 5'-^{32}P-Markierung von Restriktions-Fragmenten

Die dephosphorylierten DNA-Fragmente (Kap. 2.6.5.4.) wurden nach der Äthanol-Fällung zunächst in 2 µl H_2O und 1,25 µl 10-fach konzentriertem Polynukleotid-Kinase-Puffer (500 mM Tris/HCl pH 7,6, 100 mM $MgCl_2$, 50 mM DTT, 1,5 mM Spermidin, 1 mM EDTA) gelöst. Nach Zugabe von 8 µl γ-^{32}P-dATP (3000 Ci/mmol, 10 mCi/ml) und Start der Reaktion mit 1,25 µl T4-Polynukleotidkinase (5 Einheiten) wurde 30 min bei 37°C inkubiert (157). War die Reaktionszeit abgelaufen, wurde mit H_2O auf 50 µl Gesamtvolumen aufgefüllt und mit 50 µl gepuffertem Phenol extrahiert. Die extrahierte wässrige Phase wurde in ein neues Gefäß überführt, das Phenol nochmals mit 20 µl H_2O ausgeschüttelt und diese wässrige Phase mit der ersten vereinigt und zusammen mit 1 ml Äther extrahiert. Über eine Sephadex G-100 Säule (Kap. 2.6.9.2.) wurde markierte DNA von nicht umgesetztem γ-^{32}P-dATP getrennt.

2.6.5.6. Nicktranslation

Für die Gewinnung radioaktiv markierter Proben für Hybridisierungen wurde DNA nach (201) markiert.

DNAse I aus Rinderpankreas wurde zu 1 mg/ml in Verdünnungspuffer angesetzt und bei -20°C gelagert. Zur Aktivitätsbestimmung wurde sie in verschiedenen Konzentrationen eingesetzt, um die Konzentration wählen zu können, mit der man einen optimalen Einbau an Radioaktivität in 1 µg DNA erhält. 30 % Einbau wurde erzielt beim Einsatz von 3 bis 5 pg DNAse. Von DNA-Polymerase I (E. coli) mit Exonucleaseaktivität wurden 5 Einheiten eingesetzt, α^{32}P-dATP wurde zu 20 bis 40 µCi eingesetzt. Um die Reaktion abzustoppen, wurde 2 x mit Phenol extrahiert. Die markierte DNA wurde über Sephadex G 100 vom Isotop getrennt (Kap. 2.6.9.2.).

2.6.6. DNA-Gelelektrophorese

2.6.6.1. Agarose- und Polyacrylamidgele für analytische und präparative Trennungen von DNA-Fragmenten

Die elektrophoretische Auftrennung von DNA-Fragmenten erfolgte über Agarose- oder Polyacrylamid-Gele.

Für die Auftrennung in Agarose-Gelen wurden je nach Bedarf verschiedene Agarose-Konzentrationen verwendet (0,7 % oder 1 %). Dazu wurde Agarose in 100 ml 1 x EB-Puffer gelöst und auf eine Plexiglasplatte (12,5 cm x 12,5 cm x 1 cm) gegossen. Diese Platte wurde dazu mit 2 cm breitem Band umklebt, so daß ein überhöhter Rand entstand. Bevor die aufgegossene Agarose auf Raumtemperatur abgekühlt und erhärtet war, sorgte ein eingesetzter Kamm dafür, daß im Gel Taschen mit einem Fassungsvermögen von ungefähr 50 µl für das Auftragen von Proben ausgespart blieben. Die Elektrophorese erfolgte in horizontaler Richtung in einer Gelkammer mit

2,5 l 1 x Elektrophoresepuffer. Die DNA-Proben und ein Längenstandard wurden zusammen mit einem Farbmarker aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte bei 100 Volt konstanter Spannung.

Polyacrylamidgele wurden für die Trennung von DNA-Fragmenten 3,5 %ig oder 5 %ig benutzt. Die Acrylamidlösung wurde in einer Saugflasche entgast, TEMED zupipettiert und zwischen 2 Glasplatten (20 cm x 20 cm, eine mit Ausschnitt) mit 1,5 mm Abstandhalter gegossen. Geltaschen gewünschter Größe (2 cm x 5 cm x 1,5 mm für präparative Zwecke und 2 cm x 1 cm x 1,5 mm für analytische Zwecke) wurden mit einem Gelkamm ausgespart. Nach dem Polymerisieren wurde das Gel in die Elektrophoreseapparatur eingespannt. Als Gelpuffer wurde 1/2 x TBE benutzt. Die Elektrophorese wurde bei $4^{o}C$ und 300 Volt durchgeführt, nachdem das Gel für 30 min bei 150 Volt vorlief.

Präparativ getrennt wurden auf diese Weise sowohl unmarkierte DNA-Fragmente wie 5'- ^{32}P markierte DNA-Fragmente nach dem Nachschneiden und 5'- ^{32}P markierte DNA-Fragmente nach Strangtrennung. Für die Strangtrennung mußte der Laufpuffer kalt sein und nach Probenauftrag zuerst bei 150 Volt, später bei 300 Volt laufen (115).

Für die Birnstiel-Kartierung wurden 5 %ige, 0,5 mm dicke und 40 cm lange Acrylamidgele gegossen.

2.6.6.2. DNA-Sequenzgele

Die Auftrennung von DNA-Molekülen nach dem Sequenzieren mit der Maxam-Gilbert-Methode oder der Sanger-Methode erfolgte über 5 %, 6 %, 8 % und 20 %ige Acrylamidgele mit 8 M Harnstoff, d.h. unter stark denaturierenden Bedingungen. Die Gele waren 40 cm lang, 20 cm breit und 0,5 mm dick. Die Geltaschen hatten eine Breite von 0,8 mm. Die Gele wurden 30 min bei 35 Watt vorgelaufen. Nach Probenauftrag liefen

die Gele mit 40 Watt konstanter Leistung. Laufpuffer war 1 x TBE.

2.6.6.3. Farbmarker und DNA-Längenstandards für Gelelektrophoresen

Als sichtbarer Positions- und Auftragsmarker für die Gelelektrophorese wurde ein Gemisch von 5 % Glycerin, 0,01 % (w/v) Bromphenolblau und 0,01 % Xylencyanol FF verwendet. Für Elektrophoresen unter denaturierenden Bedingungen wurde eine Lösung von 95 % deionisiertem Formamid und 20 mM Na_2EDTA hergestellt. 10 ml dieser Lösung erhielten als Farbmarker 3 mg Brom-Phenol-Blau und 3 mg Xylencyanol FF.

Um die Größe von Restriktions-Fragmenten auf Agarose-Gelen bestimmen zu können, wurde ein Längenstandard mit aufgetragen. Dazu diente ein Pvu II- und ein EcoRI-Restriktionsverdau des Plasmids pKN410 (193). Die Größe dieser Eichfragmente beträgt: 15,5 Kb, 6,0 Kb, 2,9 Kb, 2,09 Kb, 1,65 Kb, 1,32 Kb, 0,75 Kb, 0,52 Kb und 0,275 Kb.

Als Längenstandard für Autoradiographien wurden die radioaktiv markierten Fragmente eines HinfI-Restriktionsverdaus von pBR 322 verwendet. Die Größe dieser Fragmente beträgt: 1629 Bp, 516 Bp, 506 Bp, 396 Bp, 344 Bp, 298 Bp, 221 Bp, 154 Bp, 75 Bp (183).

2.6.7. DNA-Erkennung auf Gelen

2.6.7.1. Ethidiumbromid-Färbung

Die durch Gelelektrophorese in Agarose- oder Polyacrylamidgelen aufgetrennten DNA-Fragmente wurden nach Anfärben mit Ethidiumbromid mit UV-Licht sichtbar gemacht.

Dazu wurden die Gele für 10 min in eine Ethidiumbromid-Lösung (10 µg/ml) gelegt, danach entfärbt und über einem UV-Leuchtkasten ausgewertet und photographiert. Das Photomaterial war Polaroid PN 55 und die benützte Kameraausrüstung Polaroid MP 3.

2.6.7.2. Autoradiographie

Die Position radioaktiv markierter und elektrophoretisch aufgetrennter DNA-Fragmente in Polyacrylamidgelen wurde über Autoradiographie bestimmt. Dazu wurde die Geloberfläche nach Abtrennen einer Glasplatte mit einer Frapan-Folie abgedeckt und ein Röntgenfilm aufgelegt. Je nach Stärke der Radioaktivität auf dem Gel wurde der Röntgenfilm vorsensibilisiert (99), mit einer Verstärkerfolie abgedeckt (100), mit einer Glasplatte beschwert, lichtdicht verpackt und bei -20°C exponiert. Die Exponierzeiten lagen zwischen 10 min für präparative Gele, 1 bis 2 h für Birnstiel-Gele und 16 h bis 4 Tage für Sequenzgele.

2.6.7.3. UV-'Shadowing'

Präparativ über ein Acrylamidgel getrennte, nicht radioaktiv markierte DNA-Fragmente wurden durch UV-shadowing (116) sichtbar gemacht. Das Gel wurde auf eine Kieselgel-Dünn-

schichtchromatographie-Platte mit Fluoreszenzfarbstoff (Merck, Darmstadt) gelegt und mit einer UV-Handlampe (254 nm) bestrahlt. Die DNA-Fragmente waren als dunkle Banden vor einem fluoreszierenden Hintergrund sichtbar.

2.6.8. Isolierung von DNA-Fragmenten aus Gelen über Elektroelution oder Diffusion

Zur Fragmentisolierung aus Agarose-Gelen wurde ein Randstreifen des Gels mit Ethidiumbromid angefärbt, der Sitz des gewünschten DNA-Fragments lokalisiert und aus dem ungefärbten Teil des Gels ausgeschnitten. DNA-Fragmente in präparativen Acrylamidgelen wurden über die 'shadowing'-Methode (Kap. 2.6.7.3.) sichtbar gemacht und scharf begrenzt ausgeschnitten. Die Fragmente wurden über Elektroelution aus den Agarose- oder Acrylamid-Gelstücken herausgeholt. Dazu wurden sie in einen Dialyseschlauch mit Ausschlußvolumen 12 000 bis 14 000 MW gesteckt. Der Schlauch wurde mit 1 x TE-Puffer aufgefüllt. Die beidseitig gut verknoteten Schläuche wurden in eine mit Elektrophoresepuffer gefüllte Gelapparatur quer zum verlaufenden Stromfluß gelegt. Die Elution erfolgte über Nacht bei 50 Volt. Vor Abbruch der Elektrophorese wurde die Stromrichtung für 1 min umgepolt, so daß sich die eluierte DNA von der Schlauchwandung ablöste. Grundsätzlich wurden neue Dialyseschläuche einmal in 2 mM Na_2EDTA pH 8 für 20 min gekocht und in 1 x TE-Puffer bei $4^{\circ}C$ gelagert.

Die Restriktionsfragmente wurden anschließend durch Ionenaustauschchromatographie mit DEAE-Cellulose (Kap. 2.6.9.) gereinigt.

Von ^{32}P-markierten DNA-Fragmenten wurde eine Autoradiographie angefertigt (Kap. 2.6.7.2.) und die DNA nach dem Muster auf dem Film aus dem Gel ausgeschnitten. Dazu wurde das Autoradiogramm auf einen Leuchtkasten gelegt und das Gel genau wie für die Herstellung des Autoradiogrammes auf

dem Film orientiert. Auf diese Weise konnte die markierte DNA exakt aus dem Gel geschnitten werden.

In einem verschließbaren Plastikröhrchen wurden die Gelstücke zu einer Paste zerrieben und zusammen mit 1 ml TE-Puffer bei 42°C über Nacht inkubiert. Um das Acrylamid abzutrennen, wurde die Probe über Glaswolle in einer 1 ml Gilson-Pipettenspitze filtriert (116). Die DNA wurde mit Äthanol gefällt (Kap. 2.6.4.). Da diese DNA direkt für die Sequenzreaktionen nach der Methode von Maxam und Gilbert benutzt wurde und eventuell zurückgebliebene Mg^{2+}-Ionen die Reaktion mit Hydrazin stören würden, wurden weitere Äthanolfällungen angeschlossen (116).

2.6.8.1. Sucrose-Mischgradient

Die Isolierung eines einzelnen reinen Fragments aus Agarosegelen mit statistisch geschnittener chromosomaler DNA ist nicht möglich. Was isoliert wurde, war ein Gemisch ähnlich großer DNA-Fragmente. Zur weiteren Auftrennung dieses Gemisches wurde ein Mischgradient aus 5 % (w/w) und 20 % (w/w) Sucrose (w/w) in 1 M NaAc, 10 M Tris pH 8 und 1 mM EDTA hergestellt (109). Zentrifugiert wurde 8 h bei 35 000 Upm im SW 41 Ti-Beckman-Rotor. Fraktionen zu 600 µl wurden vom Boden her abgesaugt, dialysiert und gefällt. Diese DNA wurde für die Klonierung in dem λNM 816-Vektor benutzt (Kap. 2.2.).

2.6.9. DNA-Säulenchromatographie

2.6.9.1. Ionenaustausch-Chromatographie von DNA über DEAE-Cellulose-Säulen

Die aus Gelen isolierten, nicht markierten DNA-Fragmente wurden zur Reinigung über eine DEAE-Cellulose-Säule geschickt. Dazu wurde eine Pasteur-Pipette mit einem Rondell Whatman Glasfiberfilter GF/C abgedichtet und mit 1 bis 2 cm Säulenmaterial gepackt. Die eluierte DNA wurde mit 1 x TE-Puffer 1:2 verdünnt und auf die Säule aufgetragen. Nach Binden der DNA an das Bettmaterial wurde mit 3 Säulenvolumina TE + 0,15 M NaCl nachgewaschen. Die Elution der DNA erfolgte mit 4 x 0,5 ml 1 x TE + 1 M NaCl. Die DNA wurde, nach Zugabe von 0,3 ml 3 M NaAc, 0,3 ml 0,1 M MgAc und 0,4 ml 1 x TE, mit 10 ml Äthanol über Nacht bei -50°C gefällt, abzentrifugiert, mit Äthanol nachgewaschen, getrocknet und in H_2O gelöst.

2.6.9.2. DNA-Säulen-Chromatographie mit Sephadex G 100

Mit γ^{32}P-dATP 5' markierte DNA-Fragmente (Kap. 2.6.5.5.) oder mit α^{32}P-dATP über Nicktranslation markierte DNA (Kap. 2.6.5.6.) wurden über Sephadex G 100 von nicht eingebautem ^{32}P abgetrennt. Dazu diente als Säule eine mit Glaswolle (Glaswolle sterilisiert oder mit Äthanol gewaschen und getrocknet) abgedichtete Pasteurpipette, vollgefüllt mit Sephadex G 100, equilibriert mit TE.

Das Eluat (Elutionspuffer 1 x TE) wurde in Fraktionen von 5 x 2 und 25 x 1 Tropfen aufgefangen und die Radioaktivität bestimmt (Kap. 2.6.3.).

Die Fraktionen, die den ersten Peak an Radioaktivität darstellten, wurden vereinigt und mit Äthanol gefällt. Ein zweiter, deutlich getrennter Peak kam mit den letzten Fraktio-

nen von der Säule und stellte das nicht eingebaute ^{32}P dar. Die an beiden Enden 5'-markierten DNA-Fragmente wurden für die DNA-Sequenzierung nach Maxam und Gilbert (Kap. 2.6.12.) und für die Feinrestriktionskartierung nach Birnstiel (Kap. 2.6.5.1.) zunächst mit Äthanol gefällt (Kap. 2.6.4.). Um nur an einem Ende 5'-markierte DNA zu bekommen, wurde sie mit einem Restriktionsenzym verdaut, das im Fragment asymmetrisch schneidet, und danach die Fragmente über ein Acrylamidgel gereinigt (Kap. 2.6.6.1.).

2.6.10. DNA auf Nitrocellulosefilter für Hybridisierungsversuche

2.6.10.1. Transfer von DNA auf Nitrocellulose-Filter

Nach Auftrennen von Restriktionsfragmenten über ein Agarosegel (Kap. 2.6.6.1.) und Photographieren des Gels nach Ethidiumbromidfärbung (Kap. 2.6.7.1.) war es möglich, die erhaltenen Fragmente auf Nitrocellulosefilter zu übertragen und ein identisches Replica-Muster auf dem Filter zu bekommen. Das war die Voraussetzung dafür, gewünschte Fragmente durch Hybridisierung mit spezifischen radioaktiv markierten Proben zu bestimmen.

Das Übertragen der DNA auf Nitrocellulosefilter erfolgte nach der Methode von Southern (177). Das Agarosegel wurde vorher für je 1 h mit Denaturierungslösung (0,5 M NaOH, 1,5 M NaCl) und mit Neutralisierungslösung (1 M Tris, 3 M NaCl mit HCl auf pH 5,5 eingestellt) behandelt und danach kurz mit H_2O abgespült. Als Transferlösung wurde 20 x SSC benutzt. Nach 12 bis 16 h wurde die DNA auf dem Filter im Vakuum bei 80°C für 2 h festgebacken. Nach dieser Prozedur konnte zunächst die Vorhybridisierung und dann die Hybridisierung erfolgen (Kap. 2.6.11.).

2.6.10.2. Transfer von λ-Plaques auf Nitrocellulosefilter

Die irreversible Übertragung von λ-DNA aus Phagenplaques auf Nitrocellulosefilter wurde nach der in Advanced Bacterial Genetics (4) beschriebenen Methode von Benton (10) durchgeführt.

2.6.10.3. Transfer von Bakterienkolonien auf Nitrocellulosefilter

Die Koloniehybridisierung (63) wurde durchgeführt wie in Advanced Bacterial Genetics (4) beschrieben. Dazu wurden die mit rekombinanten Plasmiden transformierten Bakterien auf Selektionsplatten zu Kolonien hochgezogen und mit Hilfe eines sterilen Samtstempels auf einen Nitrocellulosefilter übertragen. Der Filter wurde mit den überstempelten Zellen auf der Oberseite auf eine Agarplatte gelegt und für 5 bis 6 h bei 37°C inkubiert. Die Kolonien auf der Ursprungsplatte blieben erhalten und dienten als Ausgangsmaterial zum Aufarbeiten gewünschter Klone.

2.6.11. DNA:DNA-Hybridisierung

Nach dem Transfer und Festbacken der DNA auf Nitrocellulosefilter konnten die Filter für die Hybridisierungen nach der Methode von Wahl (197) verwendet werden. Um nicht-spezifische DNA-Hybridisierungen zu vermeiden, wurden die Filter mit Kalbsthymus-DNA in Denhardt-Lösung (47) während 1 bis 2 h bei 42°C vorhybridisiert. Die Vorhybridisierungslösung enthielt 50 % Formamid (deion.), 5 x SSC, 5 x Denhardt-Lösung, 5 mM $NaPO_4$-Puffer pH 6,5, 250 - 500 µg/ml Kalbsthymus-DNA, 1 % Glycin. Die Hybridisierung mit der ^{32}P-markierten DNA erfolgte danach bei 42°C während 4 bis 16 h in

folgender Lösung: 50 % Formamid (deion.), 5 x SSC, 5 x Denhardt-Lösung, 20 mM Na-Phosphat-Puffer pH 6,5, 10 % Dextransulfat und mit der Menge DNA, die mit 1 Million cpm zählbarer Radioaktivität markiert war. Die radioaktiv markierte DNA wurde zuerst 5 min im kochenden Wasserbad denaturiert und dann zu der auf 40°C vorgewärmten Lösung gegeben. Vorhybridisierung und Hybridisierung erfolgte in verschweißten Plastiktüten mit ungefähr 50 bis 100 µl der jeweiligen Lösungen pro cm^2 Filter.

2.6.12. DNA-Sequenzierung nach der chemischen Methode von Maxam und Gilbert (115)

Modifiziert wurde die Methode nach persönlichen Mitteilungen von S.T. Cole.

Die salzfreie nur an einem 5'-Ende mit γ-^{32}P-dATP radioaktiv markierte DNA lag zu Beginn der Sequenzierung in lyophilisierter Form vor. Dazu wurde die zunächst mit Äthanol gefällte DNA (Kap. 2.6.8.) in 30 µl Wasser gelöst und auf vier Eppendorf-Röhrchen verteilt: je 5 µl für die G- und die C-Reaktion und je 10 µl für die G+A- und die T+C-Reaktion. Zu jedem Röhrchen wurden 2,25 µl Kalbsthymus-Träger-DNA (1 mg/ml, behandelt mit Ultraschall) pipettiert und lyophilisiert.

2.6.12.1. Guanin-spezifische Abbaureaktion

Die Purine wurden mit dem Methylierungsreagenz Dimethylsulfat umgesetzt, wobei die N-glykosidischen Bindungen der modifizierten Moleküle zur Desoxyribose hydrolyseanfällig werden. Zur DNA wurden 200 µl Kakodylat-Mix gegeben. Die Methylierungs-Reaktion von Guanin (7-Me-G) und auch von Adenin (3-Me-A) wurde durch Zugabe von 2 µl Dimethylsulf-

oxid gestartet und lief für 40 cm Gele, wenn man die ersten 250 Bp lesen wollte, 2 min bei Raumtemperatur. Wollte man auf 1 m Gel bis zu 350 Bp lesen, wurde die Reaktion für 1 min auf Eis durchgeführt. Durch Zugabe von 50 µl DMS-Stopp-Mix und 850 µl eiskaltem Äthanol wurde die Methylierungsreaktion abgestoppt. Die DNA wurde gefällt (Kap. 2.6.12.5.).

2.6.12.2. Purin (A+G)-spezifische Abbaureaktion

Die Abspaltung des 7-Me-G läßt sich bei niedrigem pH zurückdrängen, so daß bei der Kettenspaltung bevorzugt A-Positionen betroffen sind. Die DNA wurde zusammen mit der Kalbsthymus-DNA lyophilisiert und in 15 µl 66 %iger Ameisensäure gelöst. Die Apurinierungsreaktion lief für kurze Gele 3 min bei Raumtemperatur. Abgestoppt wurde sie durch Vortexen mit 45 µl eiskaltem Wasser und 500 µl Diäthyläther. Das Ausschütteln mit Äther wurde zweimal wiederholt. Die Probe in der wässrigen Phase wurde eingefroren und 3 h lyophilisiert. Für 1 m Gele wurde die lyophilisierte DNA in 3 µl 2 %iger Ameisensäure für 10 min bei 37°C inkubiert. Danach wurde sie sofort bei -70°C eingefroren und für 3 h lyophilisiert. Nach der ersten Lyophilisierung wurde die DNA ein zweitesmal nach Lösen in 20 µl Wasser lyophilisiert.

2.6.12.3. Pyrimidin (C+T)-spezifische Abbaureaktion

Zur Reaktion mit den Pyrimidinen wurde Hydrazin verwendet, das unter Ringöffnung und Abspaltung der Base reagiert. Die Inkubation mit Piperidin führt dann zum gewünschten Strangbruch an allen modifizierten Pyrimidinpositionen der Kette. C und T werden bei dieser Reaktion mit der gleichen Wahrscheinlichkeit angegriffen. Das Volumen der DNA-Probe

(12,25 µl) wurde mit 8,75 µl H_2O auf 21 µl eingestellt. Mit 30 µl Hydrazin wurde die Reaktion gestartet und 3 min bei Raumtemperatur für 1 m Gele und 7 min bei Raumtemperatur für 40 cm Gele laufengelassen. Mit Hydrazin-Stopp-Mix wurde die Reaktion abgebrochen und mit 850 µl Äthanol gefällt (Kap. 2.6.12.5.).

2.6.12.4. Cytosin-spezifische Abbaureaktion

Zur Unterscheidung von der C+T-spezifischen Reaktion wurde die C-Hydrazin-Reaktion in Gegenwart von NaCl durchgeführt, wodurch der Angriff des Hydrazins am T unterdrückt wurde.

Zur DNA (7,25 µl) wurden 15 µl einer 6 M NaCl-Lösung gegeben und die Reaktion mit 30 µl Hydrazin gestartet. Die Laufzeit der Reaktion mit Proben für 1 m Gele war 3 min, für ein 40 cm Gel 7 min bei Raumtemperatur. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 200 µl Hydrazin-Stopp-Mix und 850 µl Äthanol abgebrochen und die DNA gefällt (Kap. 2.6.12.5.).

2.6.12.5. DNA-Fällung

Für die erste Fällung nach der Reaktion wurden die Proben 5 min bei -70°C in Trockeneis gestellt und in einer Eppendorf-Tischzentrifuge für 10 min bei 4°C zentrifugiert. Der DNA-Niederschlag wurde in 250 µl 0,3 M NaAc resuspendiert und ein zweitesmal mit 850 µl Äthanol auf Trockeneis gefällt. Danach wurde die sedimentierte DNA dreimal mit 80 % Äthanol gewaschen, getrocknet und mit Piperidin gespalten.

2.6.12.6. Piperidinspaltung

Durch die Piperidinbehandlung werden die DNA-Ketten an den modifizierten Stellen gespalten, was durch die partielle chemische Modifikation zu unterschiedlich langen DNA-Fragmenten mit einer einheitlichen Markierung am 5'-Ende führt.

Die Spaltung wurde in 50 µl 1 M Piperidin durch Erhitzen auf 90°C während 30 min erreicht. Danach wurde die DNA gefällt (174). Nach Zugabe von 50 µl 0,3 M NaAc und 400 µl Äthanol und 10 min bei -70°C wurde 15 min zentrifugiert. Die DNA wurde zweimal mit Äthanol gewaschen.

2.6.13. DNA-Sequenzierung nach der enzymatischen Methode von Sanger

Die Sequenzierung einer DNA-Region nach der Methode von Sanger (163) beruht auf dem Prinzip des Kettenabbruchs einer wachsenden Polynukleotidkette.

Dazu dienten die replikativen Doppelstrang-DNA-Formen der Phagen M13mp8 und M13mp9 als Klonierungsvektoren für ompA-Genfragmente. Diese Vektoren enthalten ein synthetisch hergestelltes 42 Bp Fragment mit Sequenzen für verschiedene Restriktionsenzyme (EcoRI, SmaI, BamHI, SalI, AccI, HincII, PstI, HindIII) im richtigen Leserahmen mit dem nachfolgenden β-Galaktosidasegen-Teil. Nach Ligierung eines Genfragments in M13mp8 oder M13mp9 (Kap. 2.6.5.3.) und Transfektion (Kap. 2.5.7.) konnten Phagen, die eine Insertion trugen, als weiße Plaques auf Agarplatten mit X-Gal als Indikator erkannt werden.

Die Zusammenstellung und Analyse der Sequenzen erfolgte mit Hilfe der Computerprogramme von Staden (179,180,181,182), die von C. Klumpp einem PDP11/3 Computer-Betriebssystem angepaßt wurden.

2.6.13.1. Komplementäre Anlagerung des Primers an die Matrizen-DNA

Die aufgearbeitete rekombinante Einzelstrang-DNA der Phagen (Kap. 2.6.1.2.) diente als Matrize für die Synthese des komplementären DNA-Stranges. Als Startstelle für die Polymerase I (Klenow) aus E. coli wurde ein synthetischer 15 Bp Primer (Biolabs), komplementär zum 3'-Ende neben der Klonierungsstelle angelagert.

Für diese Hybridisierung wurden 4 bis 6 µl Template-DNA zusammen mit 2 µl (= 5 ng) Primer und 1 µl Puffer (100 mM Tris, 100 mM $MgCl_2$ pH 7,8) in 9 µl Endvolumen (mit Wasser aufgefüllt) 5 min bei 70°C inkubiert und in einem Wasserbad langsam auf Raumtemperatur abkühlen gelassen (30 min).

Es konnten bis zu 12 Klone in einem Durchgang sequenziert werden.

2.6.13.2. Sequenzreaktionen

Für die vier Sequenzreaktionen spezifisch für Guanin, Cytosin, Thymin und Adenin wurde der Primer-Template-Mix auf 4 x 2 µl in Eppendorfgefäßen verteilt. Zu der verteilten DNA wurden nun je 2 µl Nukleotid-Didesoxynukleotid-Mix jeweils spezifisch für Guanin (G-Mix), für Adenin (A-Mix), für Thymin (T-Mix) und Cytosin (C-Mix) zugegeben. Gestartet wurden die Reaktionen durch Zugabe von jeweils 2 µl Reaktions-Mix. Nach 15 min Reaktionszeit bei Raumtemperatur wurden 2 µl Chase-Mix zugegeben und für weitere 15 min bei Raumtemperatur gelassen. Nach 30 min Gesamtreaktionszeit wurde mit Formamid-Puffer abgestoppt. Vor dem Auftragen der Proben auf die Sequenzgele mußte das Wasser in den Proben abgedampft werden, was in einer heizbaren Vakuumzentrifuge geschah. Nach 3 Minuten Kochen der Proben war die DNA im Formamid-Puffer denaturiert und konnte auf die Sequenzgele aufgetragen werden.

3. E R G E B N I S S E

3.1. Klonierung der ompA-Gene von Shigella dysenteriae, Enterobacter aerogenes und Serratia marcescens

3.1.1. Lokalisierung der ompA-Gene

Die ompA-Gene wurden auf Restriktionsfragmenten chromosomaler DNA der genannten Stämme von Shigella, Enterobacter und Serratia lokalisiert. Die nach Kaiser und Murrey (92) isolierten chromosomalen DNA's wurden dazu mit verschiedenen Restriktionsenzymen (Tab. 3) Einzel- und Doppelverdauungen (Kap. 2.6.5.1.) unterzogen, was zu statistischem Abbau der DNA's führte.

Das schon klonierte ompA-Gen von E. coli, das auf einem 4,3 Kb großen PstI-Fragment des Hybridplasmids pTU 100 (73) liegt, wurde isoliert und als radioaktiv markierte Probe (Kap. 2.6.5.5.) für die Hybridisierung (Kap. 2.6.11.) zur Identifizierung von Sequenzhomologien mit den DNA's von Shigella, Enterobacter und Serratia benutzt (Tab. 3).

Tabelle 3: Grobe Größenangaben der mit dem E. coli ompA-Gen hybridisierenden DNA-Fragmente aus Shigella, Enterobacter und Serratia

	HindIII	EcoRI	BamHI	HindIII/ EcoRI	BamHI/ EcoRI
Shigella	13,5 Kb	9,7 Kb	5,55 Kb 2,65 Kb	4 Kb	3,65 Kb 2,9 Kb 2,31 Kb
Enterobacter	>24 Kb	7,2 Kb	9,7 Kb	6,7 Kb	6,4 Kb
Serratia	21,9 Kb	8,4 Kb	3,8 Kb 1,62 Kb	6,9 Kb	3,42 Kb 1,7 Kb

Mit EcoRI verdaute chromosomale DNA von Shigella, Enterobacter und Serratia zeigte nur ein Hybridisierungssignal auf jeweils einem Fragment mit der grob bestimmbaren Größe von 9,7 Kb für Shigella, 7,2 Kb für Enterobacter und 8,4 Kb für Serratia. Das heißt, daß die Gene jeweils komplett auf einem kleineren, klonierbaren DNA-Fragment sitzen.

3.1.2. Konstruktion von λompA transduzierenden Phagen

Die hybridisierenden EcoRI-Fragmente, auf denen die jeweiligen ompA-Gene von Shigella, Enterobacter und Serratia liegen, wurden durch präparative Elektrophorese auf Agarosegelen angereichert (Kap. 2.6.6.1.). Diese Fragmente wurden in λNM816-DNA ligiert (Kap. 3.6.5.3.). Nach einer Transfektion von kompetenten E. coli 5K-Zellen wurden die rekombinanten ompA transduzierenden Phagen über Plaquehybridisierung (10) identifiziert. Ungefähr 0,2 % der erhaltenen Plaques zeigten in allen 3 Fällen ein positives Hybridisierungssignal. Von jeweils 4 mutmaßlich ompA-tragenden λ-Phagen wurden Phagenlysate aufgearbeitet, DNA isoliert und restriktionsanalytisch über Agarosegele untersucht. Sie trugen alle EcoRI-Fragmente der Größe wie die, die vorher bei der DNA:DNA-Hybridisierung der chromosomalen DNA positive Hybridisierungssignale ergaben. Die Größe der Fragmente war anhand dieser Restriktionsanalyse eindeutig und präzise mit 9,5 Kb für Shigella, 7,4 Kb für Enterobacter und 7,4 Kb für Serratia zu bestimmen.

3.1.3. Analyse der rekombinanten λ-Phagen-DNA

Der eindeutige Beweis, daß mit den klonierten EcoRI-Fragmenten die ompA-Gene kloniert wurden, erbrachte die Hybridisierung mit dem E. coli ompA-Gen (Abb. 1). Positive Hy-

bridisierung wurde in allen 3 Fällen erreicht. Die transduzierenden Phagen wurden als λompA-Sh, λompA-En und λompA-Se bezeichnet.

3.1.4. Homologie der ompA-Gene

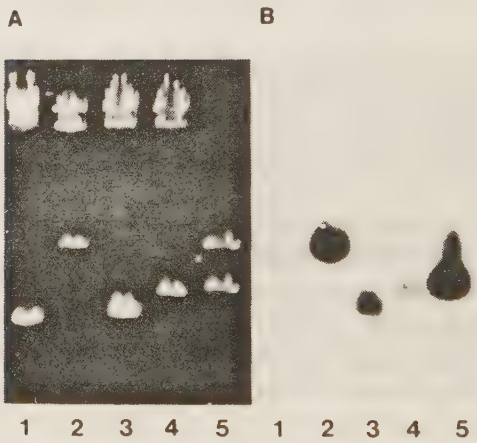


Abb. 1: Analyse der rekombinanten λ-Phagen-DNA (38)
A: Restriktionsanalyse mit EcoRI
B: Hybridisierung mit dem E. coli ompA-Gen als Probe
1, λNM816-DNA; 2, ompA-Sh; 3, ompA-En; 4, ompA-Se; 5, pTU 100 (73) trägt das E. coli ompA.

Die unterschiedlich starke Intensität der Hybridisierungssignale deutet das Ausmaß an Homologie zum E. coli ompA-Gen an. Danach ist das Shigella ompA-Gen am stärksten homolog. Danach folgt das schwächer homologe ompA-Gen von Enterobacter und das nur schwache Homologie zeigende Serratia ompA-Gen.

Shigella > Enterobacter > Serratia

Das stimmt gut mit der verwandtschaftlichen Stellung der Lipoprotein-Gene innerhalb der Enterobacteriaceae überein (133,134).

3.2. Lagebestimmung und Subklonierung der Gene

Detaillierte Restriktionsanalysen der EcoRI-Fragmente und Hybridisierungsversuche waren nötig, um die Lage der ompA-Gene, die Orientierung ihrer Transcriptionsrichtung und um geeignete Schnittstellen für Subklonierungen ermitteln zu können. Das von Maxam und Gilbert entwickelte DNA-Sequenzierverfahren erfordert die saubere Isolierung kleiner Restriktionsfragmente. Die Gewinnung solcher Restriktionsfragmente aus dem 46,8 Kb großen λompA-Sh und aus dem 45 Kb großen λompA-En und λompA-Se ist nahezu unmöglich. Da man für diese Sequenziermethode DNA auch in genügenden Mengen braucht, das ompA-Strukturgen mit ungefähr 1 Kb aber nur rund 2,2 % des DNA-Gewichtanteils der rekombinanten λ-Phagen ausmacht, der Phage und seine Derivate darüber hinaus aber nur sehr ungenügend vermehrt werden konnten (es wurden im günstigsten Falle Titer von höchstens $2,3 \times 10^9$ Phagen/ml gewonnen), mußten die ompA-Gene oder Teile der Gene in kleinere Vektoren ligiert werden.

Für die Lokalisierung der ompA-Gene und ihrer Gen-Fragmente und die Bestimmung ihrer Orientierung wurden jeweils aus pTU 100 gewonnene, markierte E. coli ompA-Fragmente, spezifisch für das 5'- und 3'-Ende des Gens, benützt.

3.2.1. Kartierung der λompA-Sh-DNA, Lokalisierung des ompA-Gens und Konstruktion von Hybridplasmiden

Die Kartierung des EcoRI-Fragments von Shigella erfolgte über Restriktionsanalyse und Hybridisierung von λompA-Sh-DNA (Tab. 4). Nach diesen Daten liegt das ompA-Gen von Shigella auf einem 4,6 Kb HindIII-EcoRI-Fragment. Es hat eine Erkennungssequenz für BamHI, da nach BamHI/EcoRI-Verdau 2 Fragmente mit dem gesamten E. coli ompA-Gen als Probe hybridisieren (Tab. 4). Man kann davon ausgehen, daß diese BamHI-Schnittstelle mit der im E. coli ompA-Gen vorkommenden BamHI-Schnittstelle übereinstimmt (8), da bei Hybridisierungsversuchen mit dem 1,78 Kb BamHI-Fragment mit dem 5'-Terminus des E. coli-Gens (8) als Probe nur das 3,27 Kb BamHI-Fragment und das 2,5 Kb BamHI-HindIII-Fragment hybridisierten, nicht aber das daneben liegende 4,13 Kb BamHI- und BamHI-HindIII-Fragment (das sind Fragmente mit jeweils Teilen von λ) (Abb. 2).

Der 5'-Terminus liegt somit auf dem 2,5 Kb HindIII-BamHI-Fragment (Tab. 4) und trägt entsprechend der Hybridisierungsprobe mindestens 2/3 der ompA-kodierenden Sequenz und den ompA-Promotor. Damit kann die Transcriptionsrichtung von links nach rechts laufend (bezogen auf den linken und rechten Arm der λNM816-DNA) angegeben werden (Abb. 2).

Es wurde versucht, entsprechende Fragmente von λompA-Sh (BamHI, BamHI-EcoRI, EcoRI-HindIII) in das Tetracyclin-Resistenz-Gen von pBR 322 unterzuklonieren. 50 % der BamHI-EcoRI Ampicillin resistenten Transformanden waren empfindlich gegenüber Tetracyclin. Von den BamHI- und EcoRI-HindIII Ampicillin-resistenten Transformanden waren nur 6,6 % empfindlich gegenüber Tetracyclin. Eine Koloniehybridisierung mit dem gesamten ompA-Gen aus pTU 100 zeigte, welche der Ampicillin-resistenten, Tetracyclin-empfindlichen Transformanden Plasmide mit ompA-Sequenzen trugen. Von Kolonien, die ein positives Hybridisierungssignal zeigten, wurde eine Minilysat-DNA-Analyse durchgeführt. 2/3 der untersuchten BamHI-EcoRI-Klone hatten das 2,2 Kb BamHI-EcoRI-Fragment auf dem pTU 1Sh genannten Plasmid (Abb. 3, Tab. 5), das die

3'-Sequenz des ompA-Gens trug (1/3 der Klone trugen das 1,9 Kb EcoRI-BamHI-Fragment vom rechten λ-Arm; Hybridisierung dieser Klone zeigte schwache unspezifische Signale).

Die BamHI-Klone trugen das 4,13 Kb Fragment ebenfalls mit dem 3'-Terminus des Gens und Sequenzen vom rechten λ-Arm.

Die EcoRI-HindIII-Klone trugen das in Abb. 2 dargestellte, links daneben liegende Fragment ohne ompA-Sequenzen.

Mit der Klonierung des für den NH_2-Terminus kodierenden Gensegments auf dem 2,5 Kb HindIII-BamHI-Fragment in das in niedriger Kopienzahl vorkommende Plasmid pHSG 415 ist die Konstruktion des Hybridplasmids pTU 3Sh (Abb. 3, Tab. 6) gelungen. Minilysat-DNA-Analyse und Hybridisierung mit der 5'-terminalen E. coli-ompA-Probe zeigten, daß 5 % der gegen Ampicillin und Chloramphenicol resistenten und gegenüber Kanamycin empfindlichen getesteten Transformanden den 5'-Terminus des Gens trugen.

Über eine Restriktionsanalyse dieses Plasmids (Tab. 6) wurden zwei brauchbare HincII-Schnittstellen im ompA-Gen 100 bp voneinander entfernt liegend erkannt (Abb. 3). Eine weitere HincII-Schnittstelle im Vektor erlaubte die Klonierung eines 1,08 Kb HincII-Fragments (470 bp des Gens und 610 bp des Vektors) in pACYC 184, das als pTU 4Sh bezeichnet wurde (nicht dargestellt).

Aus diesen Plasmiden pTU 1Sh, pTU 3Sh und pTU 4Sh wurden die Restriktionsfragmente für die DNA-Sequenzbestimmung gewonnen.

3.2.2. Lokalisierung des ompA-Gens auf λompA-Se und seine Subklonierung

Die Auskartierung des EcoRI-Fragments von Serratia erfolgte zum Teil auch über Restriktionsanalyse und Hybridisierung der λompA-Se-DNA (Tab. 7).

Das ompA-Gen liegt komplett auf einem 4,2 Kb großen EcoRI-XhoI-Fragment mit einer BamHI-Schnittstelle im Gen. Die Hybridisierung mit der 3'-terminalen E. coli ompA-Probe zeigte, daß das 3'-Ende des Gens von Serratia auf einem 1,55 Kb großen BamHI-Fragment lag (ist nicht abgebildet, da das Hybridisierungssignal ziemlich schwach war). Das rechts anschließende BamHI-Fragment ist 3,45 Kb groß, trägt somit den 5'-Terminus des Gens, und die Transcriptionsrichtung läuft von rechts nach links (bezogen auf linken und rechten Arm der λ-DNA).

Die Subklonierung der BamHI-Fragmente in das Tetracyclin-Resistenzgen von pBR 322 und Transformation von SNO1 erbrachte 2,4 % gegen Tetracyclin sensitive Transformanden (bezogen auf die Zahl der gegen Ampicillin resistenten getesteten Transformanden).

Nach Koloniehybridisierung (Kap. 2.6.10.3.) und über Aufarbeitung von Minilysat-DNA von hybridisierenden Klonen wurde festgestellt, daß alle das 1,55 Kb BamHI-Fragment trugen. Das 3,45 Kb BamHI-Fragment mit dem für den NH_2-Terminus kodierenden Teil des Gens konnte nicht gefunden werden.

Das konstruierte Plasmid wurde pTU 6Se benannt (Abb. 5, Tab. 8). Dieses Plasmid diente zur DNA-Gewinnung für die Sequenzierung des 3'-Terminus nach der Methode von Maxam und Gilbert.

3.2.3. Klonierung der EcoRI-Fragmente aus λompA-En und λompA-Se in pHSG 415

Die EcoRI-Fragmente aus λompA-En und λompA-Se-DNA wurden in das mit niedriger Kopienzahl vorkommende Plasmid pHSG 415 kloniert. Das Plasmid besitzt Resistenzgene für Chloramphenicol, Ampicillin und Kanamycin. Da die EcoRI-Schnittstelle im Chloramphenicol-Resistenzgen sitzt, war die Selektion der Transformanden auf Ampicillin-Platten und Erkennung der

fragmenttragenden Klone als auf Chloramphenicol-Replica-Platten nicht wachsende Kolonien möglich.

Transformiert wurde in beiden Fällen kompetente SNOI-Zellen mit dem jeweiligen Ligaseansatz (0,5 µg DNA auf eingesetzte Vektor-DNA bezogen). Bei dem Enterobacter-Ansatz wuchsen ungefähr 200 Ampicillin-resistente Kolonien pro Platte, davon waren 30 gegen Chloramphenicol sensitiv. Die Aufarbeitung von Minilysaten dieser Klone und Analyse der Plasmid-DNA erbrachte nur 4 Klone (2 %), die ein 7,4 Kb großes EcoRI-Fragment trugen.

Bei dem Serratia-Ansatz wurden nur ungefähr 70 gegen Ampicillin resistente Kolonien erhalten. Von 360 getesteten waren 17 gegen Chloramphenicol sensitiv und 5 davon trugen ein 4,4 Kb großes EcoRI-Fragment, was ungefähr 1,4 % entspricht.

Die erhaltenen Plasmide wurden pTU 7 En (für das klonierte EcoRI-Fragment von Enterobacter in pHSG 415) und pTU 5Se (für das klonierte EcoRI-Fragment von Serratia in pHSG 415) benannt (Abb. 7, Tab. 10 und Abb. 6, Tab. 9).

3.2.4. Restriktionskarten und tabellarische Auflistung der bei Restriktionsverdaus erhaltenen DNA-Fragmente

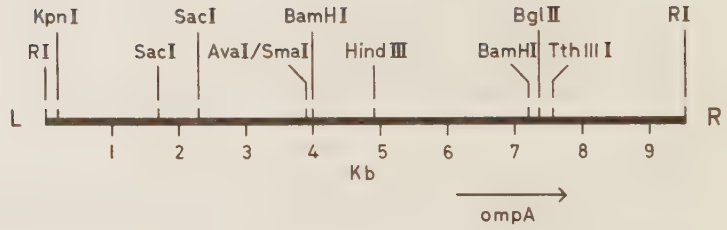


Abb. 2: Restriktionskarte des EcoRI-Fragments von λompA-Sh

Die Lage des ompA-Gens und die Richtung seiner Transcription ist mit dem Pfeil angedeutet. Mit L und R sind der rechte und linke Arm des λ-Vektors angegeben.

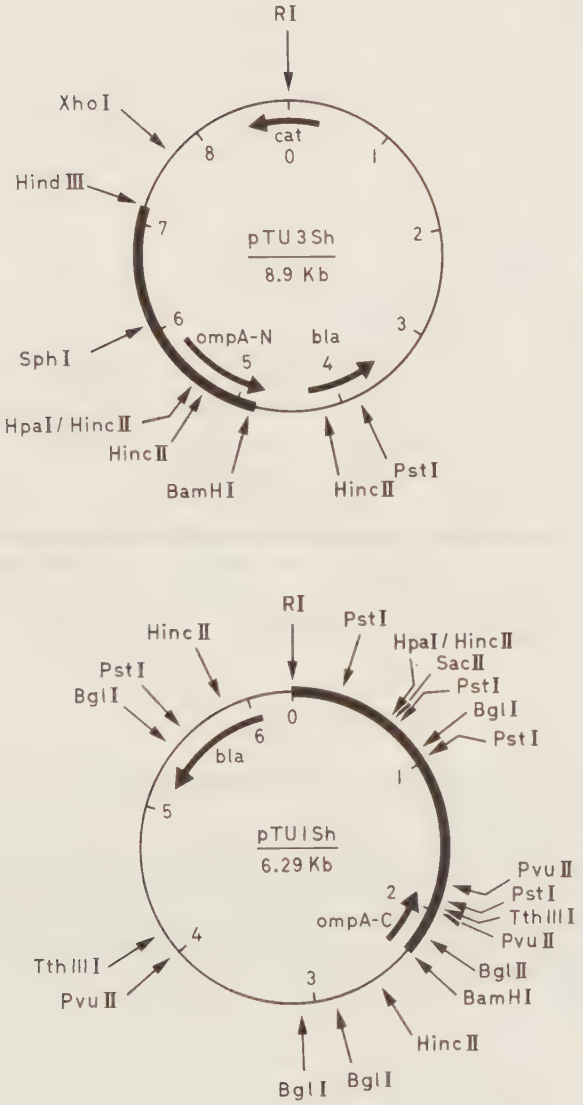


Abb. 3: Restriktionskarten der Subklone pTU 3Sh und pTU 1Sh

Die dünnen Linien repräsentieren die Vektoranteile pHSG 415 (bei pTU 3Sh) und pBR 322 (bei pTU 1Sh).

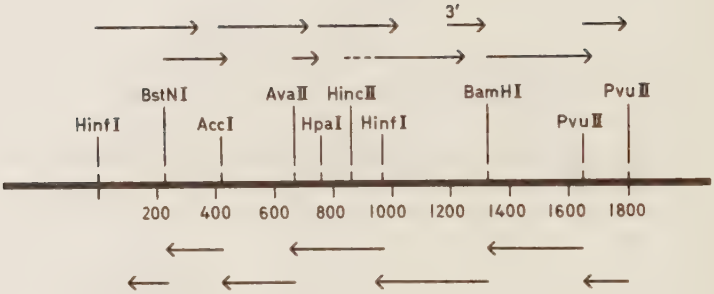


Abb. 4: Schema der Sequenzierungsstrategie für das ompA-Gen von Shigella

Dargestellt sind die Positionen, von denen ausgehend die Sequenzierung erfolgte. Die Richtung und Länge der erhaltenen Teilsequenzen ist mit dem Verlauf der Pfeile angedeutet. 3' bedeutet, daß diese Sequenz nach 3'-Endmarkierung ermittelt wurde. Die Einteilung erfolgte in Basenpaare.

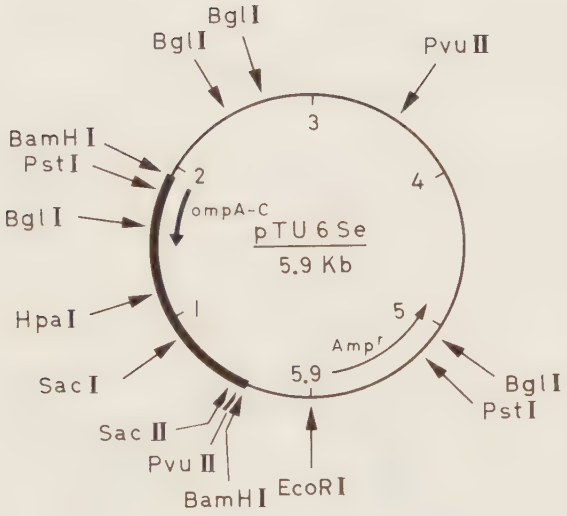


Abb. 5: Restriktionskarte von pTU 6Se

Dargestellt ist der klonierte 3'-Terminus des Serratia ompA-Gens in pBR 322.
Die dick gezogene Linie zeigt das klonierte 1,5 Kb BamHI-Fragment mit Lage und Richtung des ompA-C.

Abb. 6: Restriktionskarte von pTU 5Se und Sequenzierungsstrategie für das ompA-Gen von Serratia

Die dick gezeichnete Linie stellt das klonierte 7,4 Kb EcoRI-Fragment dar. Die dünne Linie repräsentiert den Vektoranteil (pHSG 415). Mit dem Pfeil ist die Lage des ompA-Gens und seine Transcriptionsrichtung angegeben. Ebenso ist die Lage des vor dem ompA-Gen liegenden sulA-Gens angedeutet.
Aus dem vergrößert dargestellten Ausschnitt sind die Positionen der Restriktionsschnittstellen, von denen ausgehend die Sequenzierung erfolgte, zu ersehen.
Die Richtung und Länge der erhaltenen Teilsequenzen ist mit dem Verlauf der Pfeile angedeutet.
Die Einteilung von pTU 5Se erfolgte in Kb (Kilobase), die des ausgestellten vergrößerten Bereiches in Bp (Basenpaare), wobei 1 Kb = 10^3 Bp sind.

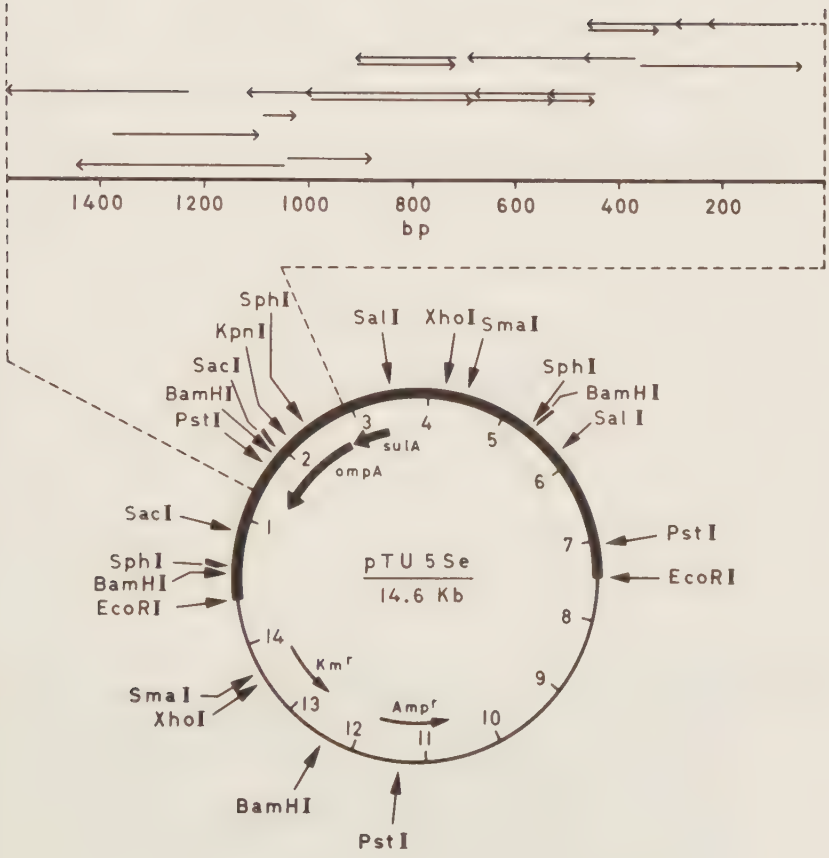

AluI
HpaI
HaeIII
RsaI
BglI
BamH
1400
1200
1000
800
600
400
200
bp
SphI
KpnI
SacI
BamHI
PstI
SalI
XhoI
SmaI
SphI
BamHI
SalI
sulA
ompA
SacI
SphI
BamHI
EcoRI
pTU 5Se
14.6 Kb
PstI
EcoRI
Kmr
SmaI
XhoI
Ampr
BamHI
PstI

Abb. 7: Restriktionskarte von pTU 7En und die Sequenzierungsstrategie für das ompA-Gen von Enterobacter

Die dicke Linie stellt das klonierte EcoRI-Fragment dar. Die dünn gezeichnete Kreishälfte repräsentiert den Vektoranteil von pTU 7En.
Mit der Pfeilrichtung ist die Lage des ompA-Gens und seine Richtung angedeutet. Ebenso ist die Lage des sulA-Gens eingezeichnet.
Der vergrößert dargestellte Ausschnitt erklärt die Sequenzierungsstrategie für das Gen. Dargestellt sind die Positionen, von denen ausgehend die Sequenzierung erfolgte. Die Pfeile geben die jeweils ermittelten Sequenzabschnitte an. Die Einteilung erfolgte in Kb, die des vergrößert dargestellten Bereiches in Bp, wobei 1 Kb = 10^3 Bp sind.

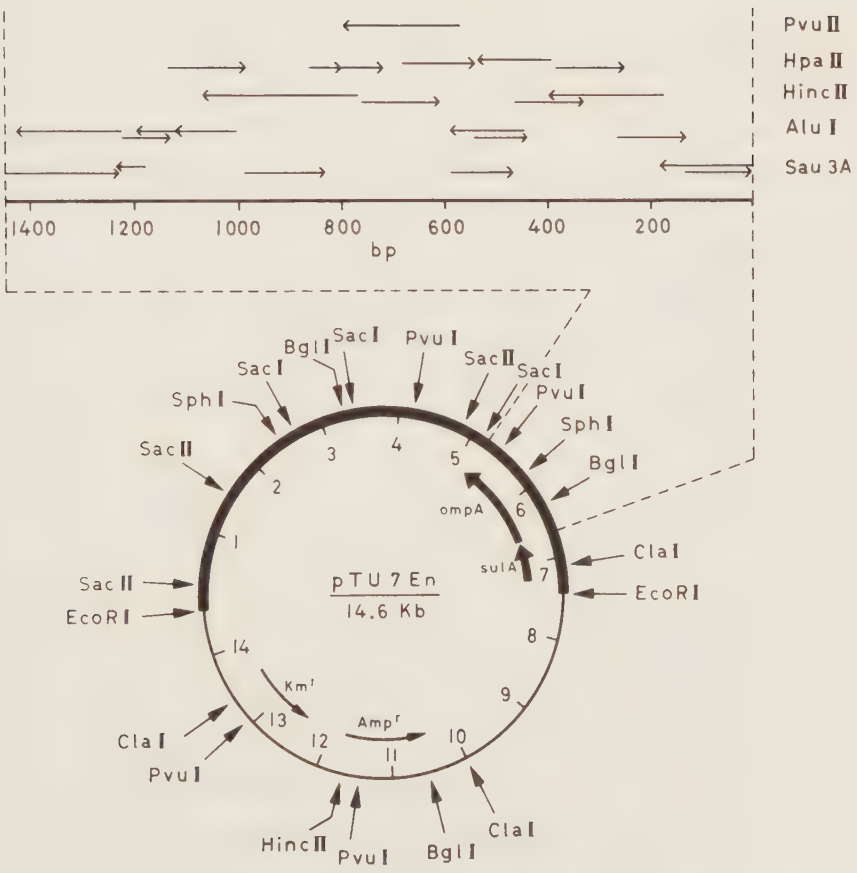

Pvu II
Hpa II
Hinc II
Alu I
Sau 3A
1400
1200
1000
800
600
400
200
bp
Bgl I
Sac I
Pvu I
Sac II
Sac I
Sac I
Sph I
Pvu I
Sac II
Sph I
Bgl I
ompA
Cla I
sulA
Sac II
EcoR I
EcoR I
pTU 7 En
14.6 Kb
Km r
Amp r
Cla I
Pvu I
Hinc II
Pvu I
Bgl I
Cla I

Tabelle 4: Restriktionsanalyse der λompA Sh-DNA

Enzyme	Größe der Restriktionsfragmente Kb
EcoRI	18,9+ 17+ 9,1 (G) 1)
BamHI	17,9 15,5+ 9,53+ 4,13 (G) 3,27 (G,N) 2)
BamHI/EcoRI	16+ 14,5+ 5,53+ 3,27 (G) 2,2 (G) 1,92
HindIII	> 11,7+ 5,9 (G) 4,5+ 3)
HindIII/EcoRI	> 19,5+ 18+ 13,5 12+ 9,2 (G)6) 5,6 4,62 (G) 4,48
SmaI	>> 5,8
SmaI/EcoRI	>> 9,1 (G)5) 5,8 (G) 3,5
BglII	> 13,2 (G) 7,16+
BglII/EcoRI	> 10,6+ 7,16+ 7,4 (G) 2,3 1,9 (G)
SacI	>> 0,78
SacI/EcoRI	>> 6,9 1,65 0,78
BamHI/HindIII	>> 5,4 4,3 3,5 3,2 (N)7) 2,52 (N)

1) Linker und rechter Arm von λNM816; erwartet 19,9 Kb und 17,5 Kb

2) Anhand der schon bekannten Restriktionsschnittstellen von λNM816 konnten bestimmte Fragmente erwartet werden. Diese Fragmente sind mit einem + ausgezeichnet

3) >; dieses Zeichen bedeutet, daß die Fragmente zu groß waren für eine zuverlässige Fragmentgrößenbestimmung

4) G, N; diese Zeichen bedeuten das ausgezeichnete Fragment, hybridisiert mit dem gesamten (G) oder mit der 5'-terminalen Probe (N) des E. coli ompA-Gens

5) EcoRI-Fragment ist nicht komplett von SmaI geschnitten

6) EcoRI-Fragment ist nicht komplett von HindIII geschnitten

7) BamHI-Fragment ist nicht komplett von HindIII geschnitten

Tabelle 5: Restriktionsanalyse von pTU 1Sh

Enzyme	Größe der Fragmente in Kb				
EcoRI/BamHI	4	2,3			
BglII/EcoRI	4,2	2,2			
HpaI	6,3				
HpaI/EcoRI	5,6	0,545			
HpaI/BamHI	4,85	1,58			
BglI	2,51	1,98(DB)	0,286		
BglI/EcoRI	2,51	1,98	0,92(DB)	0,286	
BglI/BamHI	2,51	1,98	1,32	0,57	0,286
PstI	3,6	1,01	0,91	0,293	0,27
PstI/EcoRI	3,6	1,01	0,7	0,293(DB)	0,27
PstI/BamHI	3,35	0,91	0,38	0,293	0,27
SacII/EcoRI	5,6	0,64			
BglI/BglII	2,51	1,98	1,2	0,7	0,286
PvuII	4,12	2,16	0,19		
PvuII/EcoRI	2,5	2,16	1,82	0,19	
PvuII/Bam	4,12	1,79	0,335	0,19	

Tabelle 6: Restriktionsanalyse von pTU 3Sh

Enzyme	Größe der Fragmente in Kb
HpaI	8,9
HpaI/PstI	7,5 1,6
HpaI/HindIII	7 1,8
SphI/EcoRI	6,2 2,9
SphI/HindIII	8 1
HincII	4,2 3,4 1,1 0,1

Eine HpaI-Schnittstelle ist gleichzeitig eine HincII-Schnittstelle

Tabelle 7: Restriktionsanalyse von λompA-Se

Enzyme	Größe der DNA-Fragmente in Kb
EcoRI	7,4 (G)
BamHI/EcoRI	15,5 5,4 3,45 (G) 2,48 1,96 1,55 (G) 0,31
SacI	22 (DB) (G) 0,88 (G)
SacI/EcoRI	20 7,6 6,6 5,6 (G) 1,88? 0,95 (DB) (G)
XhoI	24,2 (G) 9,9 (DB)
XhoI/EcoRI	20,2 9,2 7,1 4,2 (G) 3,2
SmaI/EcoRI	21 11,6 5,5 3,7 (G)

G: Hybridisierungssignale mit dem gesamten ompA-Gen als Probe

DB: Doppelbanden

Tabelle 8: Größe der Restriktionsfragmente von pTU 6Se

Enzyme	Größe der Fragmente in Kb			
PvuII/SacI	2,78	2,62	0,56	
PvuII/SacII	3,11	2,79	0,15	
PvuII/HpaI	2,8	2,52	0,69	
PvuII/PstI	3,12	1,7	1,1	
PvuII	3,1	2,7		
PvuII/EcoRI	3,22	2,3	0,4	
SacI/EcoRI	4,78	0,96		
SacII/EcoRI	5,6	0,455		
PstI/EcoRI	4,8	0,71		
HpaI/EcoRI	4,7	1,08		
Xho/EcoRI	5,9			
SmaI/EcoRI	5,9			
BglI/EcoRI	2,3(DB)		0,88	0,15?

Tabelle 9: Restriktionskartierung von pTU 5Se

Enzyme	Größe der Restriktionsfragmente in pTU 5Se					
BamHI	6,3	3,5	2,6	1,55		
SacI	13	0,96				
SalI	11,2	2,55				
SmaI	9,2	5,1				
SphI	9	3,1	2			
PstI	5,4	4,3	4,15			
XhoI	9	5,2				
BamHI/SphI	6,6	3	2,65	1,42?	0,56	0,25
SalI/SphI	8,5	2,3	1,75	1,2	0,4	
SacI/SphI	9,1	3	0,9	0,52		
SalI/EcoRI	7,2	3,6	2,4	1,5		
BamHI/SalI	6	2,65	1,85	1,55	1,4	0,84
SmaI/XhoI	9,6	5,5	0,6	0,3		
SphI/XhoI	7,1	2,3	1,95	1,6	0,86	
KpnI/SphI	9	3,1	1,65	0,25		
SphI/EcoRI	7,2	3	2	1,9	0,42	
XhoI/EcoRI	5,3	4,2	3,3	1,18		

Tabelle 10: Restriktionsanalyse von pTU 7En

Enzyme	Größe der DNA-Fragmente in kb						
SphI	10,2	3,5					
SphI/HindIII	6,8	4,05	3,38				
BglI	6	4,9	3,03				
ClaI	7,6	3,38	3,1	∿0,3			
ClaI/EcoRI	6,3	3(DB)	1,3	0,5			
BglI/EcoRI	3,85	3,45	2,9	1,28			
SacI/EcoRI	7,1	2,63	2,38	1,65	0,83		
BglI/HindIII	4,92	4,5	3,05	1,79			
ClaI/SphI	3,66	3,45(DB)	3,19	1,22			
SacII/EcoRI	7,05	3,28	2,63	1,21	∿0,3		
SacII/HindIII	7,62	3,24	1,74	1,18			
SacI/BglI	5,2	4,95	1,71	1,27	0,72		
PvuI	6,58	6	1,6				
PvuI/EcoRI	5	4,05	2,18	1,62DB			
SphI/EcoRI	7	3,35 (C/G)	2,42	1,76 (G)			
SacI	11,8 (C/G)	1,65	0,75				
SacI/SphI	11 (G)	1,79	0,8 (G/C)	0,7	∿0,2		
SacII	9 (C/G)	3,1	1,23				
SacII/SphI	8,1 (G)	2,46	1,2	DB0,88 (G/C)			
HincII	4,24	3,73	3,06	1,18 (G/C)	0,82	0,352 (G)	0,3 (G)
PvuII	6,18	2,7 (G/C)	1,98 (G/C)	1,28	0,438 (G)	0,295	
ClaI/BglI	4,1	3,35	2,95 (G/C)	2,13	0,84	0,75 (G)	

Aus dieser Tabelle sind die hybridisierenden Fragmente zu ersehen. G, Hybridisierung erfolgte mit dem gesamten E. coli ompA-Gen als Probe. C, Hybridisierung erfolgte mit dem 3'-terminalen Teil des E. coli ompA-Gens. DB, Doppelbanden. Das in pHSG 415 klonierte EcoRI-Fragment hat keine Restriktionsschnittstellen für die Enzyme HindIII, BamHI, SmaI, XhoI und HpaI. pHSG 415 hat keine Erkennungssequenzen für SphI, SacI, SacII, BglII und SalI.

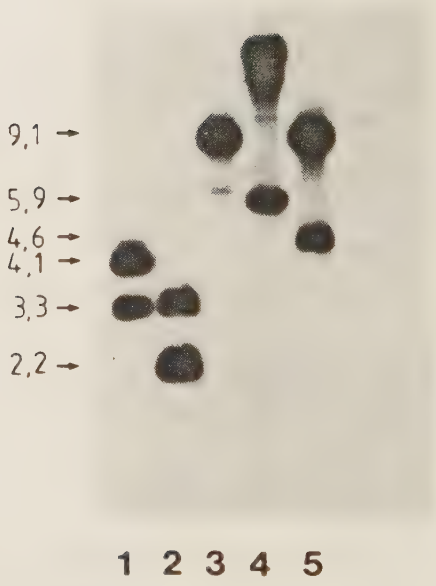


Abb. 8: DNA:DNA-Hybridisierung mit λompA-Sh Restriktionsfragmenten und dem gesamten E. coli ompA-Gen als Probe.
Die λompA-Sh-DNA ist geschnitten mit 1, BamHI, 2, BamHI/EcoRI, 3, EcoRI, 4, HindIII, 5, HindIII/EcoRI, wobei HindIII nicht komplett geschnitten hat. Vgl. Tab. 4.

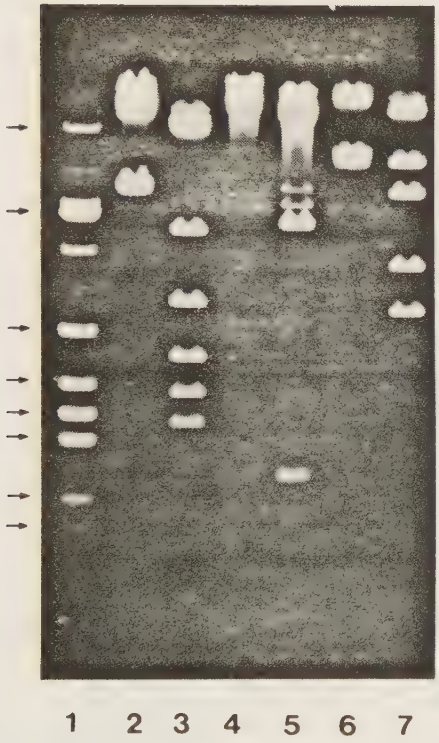


Abb. 9: Restriktionsverdau von λompA-Se

1, DNA-Längenstandard; Fragmente, deren relative Beweglichkeit die Erstellung einer Eichkurve ermöglicht, sind mit Pfeilen angedeutet; ihre Größe ist in Kap. 2.6.6.3. zu finden.
Die λompA-Se-DNA ist geschnitten mit 2, EcoRI, 3, BamHI/EcoRI, 4, SacI, 5, SacI/EcoRI, 6, XhoI, 7, XhoI/EcoRI.
Die Größe der jeweiligen Fragmente ist aus Tab. 7 zu ersehen.

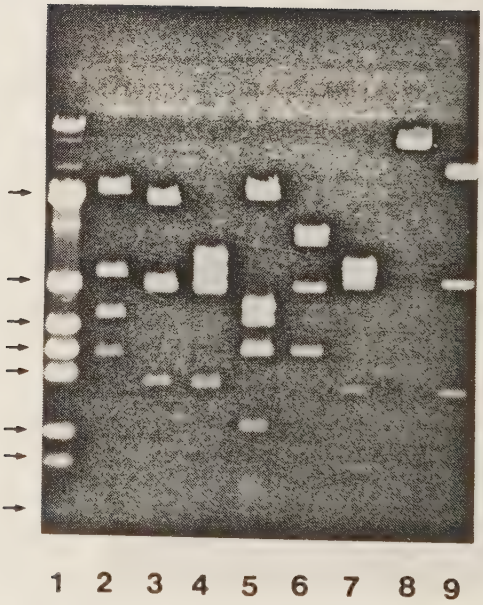


Abb. 10: Restriktionsmuster von pTU7En nach Verdauungen mit 2, SphI/EcoRI, 3, ClaI/EcoRI, 4, BglI/EcoRI, 5, SacI/EcoRI, 6, BglI/HindIII, 7, ClaI/SphI, 8, HpaI, 9, SacII.
1, Fragmente des Längenstandards sind mit Pfeilen markiert; ihre Größe ist aus Kap. 2.6.6.3. zu entnehmen.

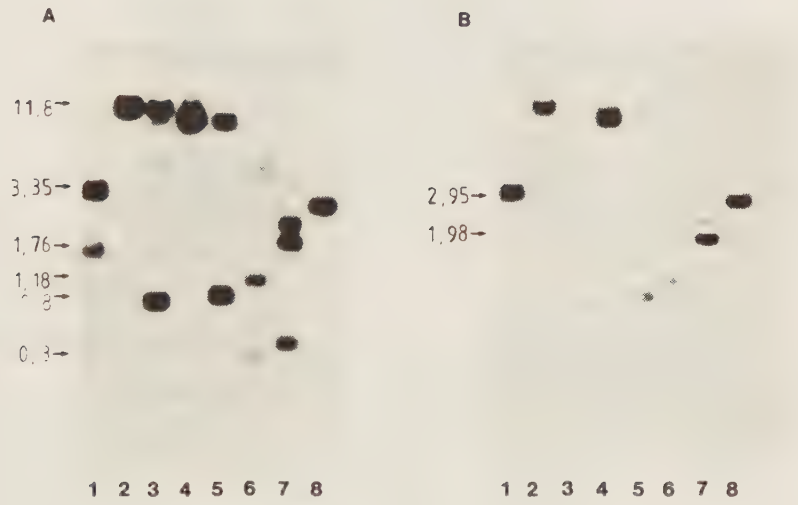


Abb. 11: DNA:DNA-Hybridisierung mit pTU7En-Restriktionsfragmenten und
A, dem Gesamt-ompA-Gen aus E. coli
B, dem 3'-terminalen Genstück aus E. coli als Probe.
pTU7En ist verdaut mit 1, SphI/EcoRI, 2, SacI,
3, SphI/SacI, 4, SacII, 5, SacII/SphI, 6, HincII,
7, PvuII, 8, ClaI/BglI.

3.3. Ausprägung der klonierten ompA-Gene im fremden Wirt

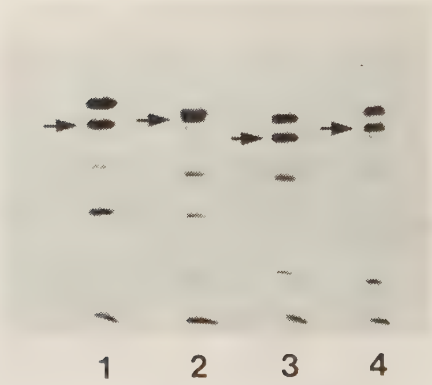


Abb. 12: Darstellung der OmpA-Proteine von Shigella, Enterobacter und Serratia (35)

SDS-Polyacrylamid-Gel von Zellhüllen von 1, Serratia marcescens, 2, Shigella dysenteriae, 3, Escherichia coli K12 UH 99, 4, Enterobacter aerogenes. Die Pfeile zeigen die jeweiligen OmpA-Proteine. Die Banden über den OmpA-Proteinen sind die OmpC- und OmpF-Proteine.

3.3.1. Ausprägung in λompA lysogenen E. coli K12

Um die Ausprägung der klonierten Gene zu prüfen, wurde der E. coli K12-Stamm UH 100 (ompA$^-$) mit den rekombinanten Phagen λompA-En und λompA-Se lysogenisiert. Um die Ausprägung des Shigella ompA-Gens zu prüfen, mußte der Stamm UH 302 (ompA$^-$ ompF$^-$ ompC$^-$) mit λompA-Sh lysogenisiert werden, da das Shigella OmpA-Protein wie die OmpF- und OmpC-Proteine von E. coli K12 laufen. Die Zellwände dieser Zellen wurden aufgearbeitet (73) und die Proteine über ein SDS-Gel aufgetrennt (38).

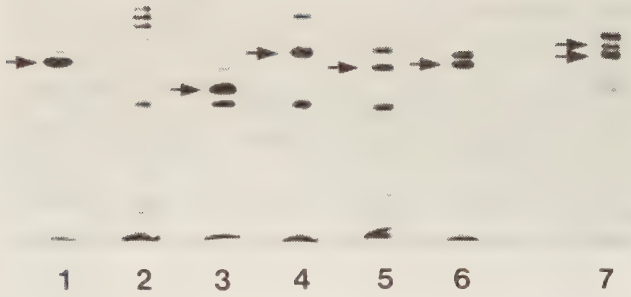


Abb. 13: SDS-Polyacrylamid-Gel von E. coli K12-Zellhüllen

Mit den Pfeilen werden die ompA-Proteine von 1, UH 100 lysogen für λompA-Se, 2, UH 302 (OmpA⁻, OmpF⁻ und OmpC⁻), 3, UH 302 lysogen für λompA-Sh (gelöst bei 50°C), 4, UH 302 lysogen für λompA-Sh (gelöst bei 100°C), 5, UH 99 (OmpA+), 6, UH 100 lysogen für λompA-En, 7, UH 99 lysogen für λompA-En mit ausgeprägtem OmpA von E. coli und Enterobacter.

Das Ergebnis zeigte (Abb. 13), daß die Ausprägung der ompA-Gene im fremden Wirt erfolgt. Damit kann auch angenommen werden, daß das "Processing" des Vorläuferproteins, der Export und die Einlagerung des Proteins in die äußere Membran richtig stattfindet und nach den gleichen molekularen Vorgängen wie beim E. coli OmpA abläuft. Die Ausprägung der Gene läuft im fremden Wirt offenbar so effektiv wie im Elternstamm ab. Die im Fremdwirt synthetisierten Proteine laufen gleich wie die aus dem Elternstamm. Das Shigella OmpA läuft entsprechend einem Molekulargewicht von 36 000, das von Enterobacter wie 34 000 und das von Serratia wie 34 500. Darüber hinaus ist die gemeinsame Ausprägung zweier verschiedener Gene möglich, wie der Hybridstamm UH 99 (λompA-En) zeigt. Das E. coli OmpA wird zusammen mit dem Enterobacter OmpA

ausgeprägt und beide liegen in gleichen Mengen vor. Das Phänomen der temperaturabhängigen Mobilität des OmpA-Proteins von E. coli (60,131,156,166) ist hier auch für das Shigella OmpA demonstriert.

3.3.2. Eigenschaften der λompA lysogenen E. coli K12-Stämme

Mit den λompA-Sh, λompA-En und λompA-Se transduzierenden Phagen war es möglich zu testen, welche Eigenschaften das fremde OmpA-Protein in E. coli K12 im Vergleich zum Elternstamm zeigt.

Die Lysogenen UH 101 (λompA-Sh), UH 101 (λompA-En) und UH 101 (λompA-Se) wurden auf Empfindlichkeit gegenüber den ompA-spezifischen Phagen Ox2 und K3 getestet. Alle λompA-Sh-Lysogene (4 getestete) waren empfindlich gegenüber Ox2, aber resistent gegenüber dem Phagen K3 und verhielten sich somit genau wie der Elternstamm Shigella gegenüber diesen Phagen.

Keiner der λompA-En und λompA-Se lysogenen Stämme (auch jeweils 4 getestet) war empfindlich gegenüber dem Phagen K3 oder Ox2. Phagenbindungstests ergaben, daß sie die Phagen auch nicht inaktivieren.

3.3.3. pTU 3Sh, pTU 7En, pTU 5Se tragende E. coli-Zellen und ihre Eigenschaften

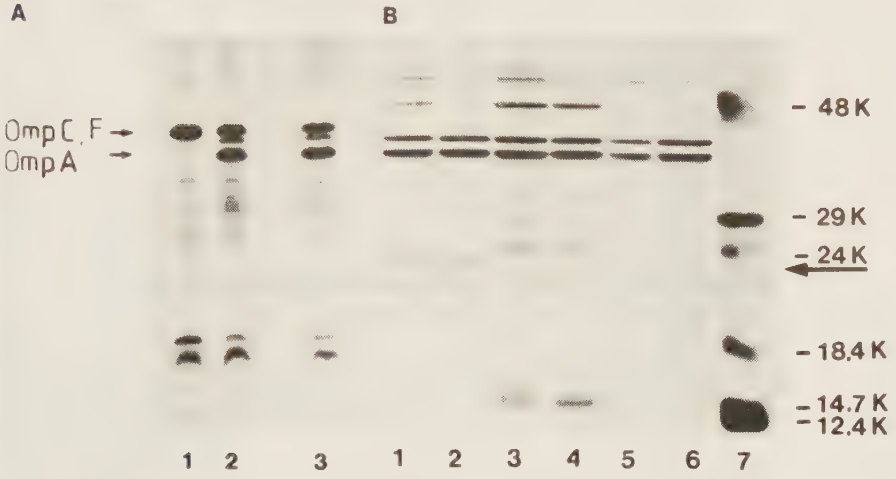


Abb. 14: A. OmpA-Proteine von Shigella, Enterobacter und Serratia, ausgeprägt in transformierten W 620-ompA$^+$-Zellen.
1, Shigella OmpA, läuft zusammen mit OmpF und OmpC; 2, Serratia OmpA; 3, Enterobacter OmpA.

B. Das ausgeprägte OmpA-Teilprotein von Serratia in dem M13 mp9Se1 tragenden JM103-Stamm (s. Kap. 3.4.)
1,2 Probe von JM103, infiziert mit M13 mp9Se1
3,4 Probe von JM103, infiziert mit M13 mp9
5,6 Probe von JM103
Die Proben 1, 3, 5 wurden 3 h und die Proben 2, 4, 6 jeweils 6 h nach der Phagen-Infektion entnommen.

OmpA-Mutanten von E. coli, deren Rezeptorspezifität für einen Phagen verändert ist, können oft immer noch den Rezeptor für die Wirtsbereichsmutanten des Phagen darstellen (41, 72) . Daher wäre es möglich, daß sowohl das Enterobacter OmpA wie das Serratia OmpA, die beide weder Rezeptor für Ox2 noch K3 darstellen, so verändert sind, daß sie durchaus noch mit Wirtsbereichsmutanten von Phagen reagieren. In Tabelle 11 sind die Eigenschaften der OmpA-Proteine von Shi-

Tabelle 11: Eigenschaften der OmpA-Proteine von Shigella, Enterobacter und Serratia

	Test auf Phagen-Empfindlichkeit gegen Ox2 und K3 und Wirtsbereichsmutanten dieser Phagen					Colicin-Empfindlichkeit			Konjugation
	Ox2	Ox2h1	Ox2h5	K3	K3h1	L	K	4-59	
UH 99	E	E	E	E	E	E(16)	E(256)	U(<1)	+
UH 100	R	R	R	R	R	U(<1)	U(64)	U(<1)	-
JC6650ompA$^+$	E			E	E	E(16/64)	E(256)	U(<1)	+
JC6650ompA$^-$	R			R	R	U(<1)	U(32/64)	U(<1)	-
JC6650omp$^-$pTU3Sh	E			R	R	U(<1)	E(256/1024)	E(16)	+
UH100pTU7En	R	R	R	R	R	E(128)	U(64)	U(<1)	-
JC6650omp$^-$pTU5Se	R			R	R	U(<1)	U(64)	U(<1)	-
S. dysenteriae	E			E	E	U(<1)	N.t.	N.t.	
E. aerogenes	R	R	R	R	R	U(<1)	U(1)	U(<1)	N.t.
S. marcescens	R			R	R	U(<1)	N.t.	N.t.	

E = empfindlich, R = resistent, U = unempfindlich (kann tolerant oder resistent sein; Bindung wurde nicht getestet). Für die Colicin-Empfindlichkeit wird in Klammern die Verdünnungsstufe des Colicinpräparates angegeben, die noch komplette Lyse macht. N.T. = nicht getestet.

gella, Enterobacter und Serratia dargestellt und aufgeführt, welche Eigenschaften hinsichtlich Phagen- und Colicin-Empfindlichkeit und Konjugation sie einem E. coli ompA$^-$-Stamm vermitteln.

3.4. Sequenzierungsstrategien

Das Gen von Shigella wurde nach der Methode von Maxam und Gilbert sequenziert.

Zur Vereinfachung der DNA-Sequenzierung wurden von entsprechenden Regionen Partial-Verdauungen nach der Methode von Smith und Birnstiel (Kap. 2.6.5.1.) durchgeführt. Nach Markierung von pTU 1Sh (Abb. 3) an der BamHI-Schnittstelle und Nachschneiden mit EcoRI konnte die Promotor-distale Region auskartiert werden.

Eine Feinrestriktionskarte für die den Promotor tragende Region wurde mit dem aus pTU 3Sh (Abb. 3) isolierten knapp 1 Kb großen HinfI-Fragment erstellt. Die ermittelten Restriktionsschnittstellen boten die Möglichkeit für die in Abb. 4 dargestellte Sequenzierungsstrategie.

Für die Sequenzermittlung, ausgehend von der HincII-Schnittstelle in Richtung BamHI-Schnittstelle, wurde die DNA aus pTU 4Sh gewonnen. Für die Markierung am 3'-Ende wurde pTU 4Sh mit BamHI geschnitten und das überhängende 5'-Ende mit dGTP und α^{32}P-dATP aufgefüllt und mit HincII nachgeschnitten.

Der für den CO_2H-Terminus kodierende Teil des Serratia ompA-Gens wurde nach der Methode von Maxam und Gilbert sequenziert. Das dazu notwendige 1.55 Kb BamHI-Fragment wurde aus dem Plasmid pTU 6Se (Abb. 5) isoliert. Nach Markierung des Fragments an den BamHI-Schnittstellen, Nachschneiden mit SacI und Isolierung des einseitig ^{32}P-markierten 1,05 Kb SacI-BamHI-Fragments konnte eine Freinrestriktionskartierung nach Birnstiel durchgeführt werden. Danach wurde sequenziert wie in Abb. 6 dargestellt.

Der für den NH_2-Terminus bis zur BamHI-Schnittstelle kodierende Teil des Gens wurde nach der Methode von Sanger et al. sequenziert. Um den Anschluß an die BamHI-Schnittstelle zu bekommen, wurde von der BamHI-Schnittstelle ausgehend in Richtung Promotor sequenziert. Dazu diente der rekombinante M13mp9 Phage mit dem BamHI-SalI-Insert (M13mp9Se1) als Matrize (Abb. 6).

Der weitere Plan war, aus der replikativen Form des Phagen das BamHI-SalI-Fragment für die "shot-gun"-Klonierung in M13 zu gewinnen. Der rekombinante Phage blieb aber nicht stabil. Aus einer ursprünglich homogenen Phagenpopulation wurden nach der Vermehrung Phagen isoliert, deren DNA's unterschiedliche Größen hatten. Das bestätigt die Beobachtungen anderer Arbeitsgruppen (pers. Mitteilung von R. Cortese und H. Schaller), daß ein M13 Phage mit einem mehr als 1 Kb großen, in sein Genom eingesetzten DNA-Stück instabil ist und Deletionen erleidet.

Interessant ist die erfolgreiche Klonierung des 5'-Endes des ompA-Gens (2/3 des Gens, kodierend für 238 Aminosäuren, einschließlich Signalsequenz) aber insofern, da es bisher nie gelang, entweder so einen großen Teil des 5'-Endes des Gens, oder das gesamte Gen wegen des für die Zelle lethalen Gen-Dosis-Effekts (73) in ein Plasmid mit hoher Kopienzahl zu klonieren. Da die Phagen in ihrer replikativen Form in der Zelle aber zahlenmäßig einem solchen Plasmid vergleichbar sind, war es erstaunlich, daß das Teilprotein in JM 103 ausgeprägt wurde und in der äußeren Membran erschien (Abb. 14 B, Kap. 3.3.3.).

Für die "shot-gun"-Klonierung wurde das 3,55 Kb EcoRI-SalI-Fragment aus pTU 5Se isoliert. Über Plaquehybridisierung mit der 5'-terminalen Probe aus E. coli wurde bestimmt, welche rekombinanten Phagen Teilsequenzen des EcoRI-BamHI- oder des BamHI-SalI-Fragments trugen. Aus allen nicht hybridisierenden Phagenplaques wurde Matrizen-DNA aufgearbeitet. Die gefundenen Klone, die zur Aufklärung der Gensequenz verhalfen, sind in Abb. 6 dargestellt.

Das Enterobacter ompA-Gen wurde nach der Methode von Sanger et al. sequenziert. Aus den Hybridisierungsstudien (Tab. 10) war bekannt, daß es 3 HincII-Fragmente mit ompA-Sequenzen gibt. Von pTU 7En ausgehend, wurden diese Fragmente in M13mp9 kloniert und sequenziert. Sonst wurde das 2,63 Kb große EcoRI-SacI-Fragment für die "shot-gun"-Klonierung mit den Enzymen HpaI, AluI, Sau3A, HaeIII und PvuII benutzt (Abb. 7).

3.5. Die ompA-Gene

Während der Sequenzierung des ompA-Gens von E. coli (8) wurde eine offene Leserastersequenz mit der Kodierungskapazität für ein Protein von einem Molekulargewicht von 17 000 ermittelt. Henning et al. entdeckten danach in einem zellfreien Proteinsynthesesystem mit Plasmiden, die das ompA-Gen und das bis dahin hypothetische Gen trugen, daß ein entsprechendes Polypeptid in großen Mengen produziert wurde. Kürzlich wurde sulA als das Gen erkannt, das für SulA kodiert, einem Protein, das eine Rolle im SOS-System der Zelle spielt. Die SOS-Antwort einer Zelle ist ein Zusammenspiel vieler zellulärer Funktionen, induziert nach DNA-Schädigung durch verschiedene Faktoren. Die Ausprägung des LexA kontrollierten sulA-Gens wird offensichtlich durch DNA zerstörende Agenzien induziert (83) und ist ein Inhibitor der Zellteilung (61,82).

Während der Sequenzierung des Shigella-, Enterobacter- und Serratia-ompA-Gens wurde jeweils auch ein zweites offenes Leseraster gefunden. Die ermittelten Sequenzabschnitte sind dem E. coli sulA homolog. Diese Gene liegen wie bei E. coli auch vor dem jeweiligen ompA-Gen.

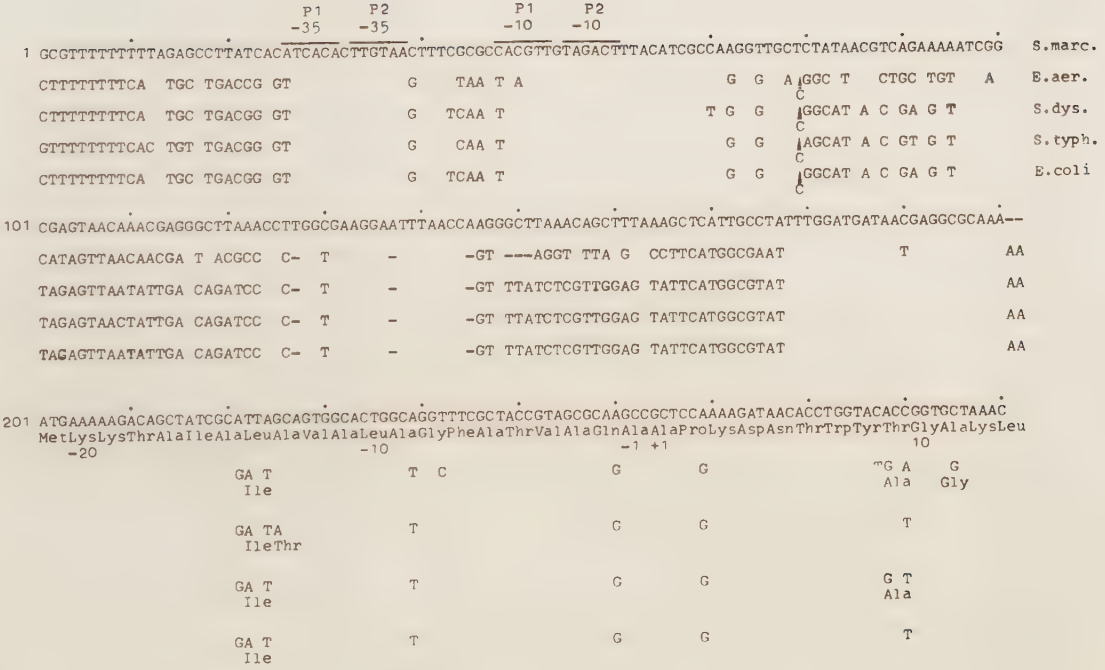
Die "Spacer"-Region zwischen Translationsterminationscodon des jeweiligen sulA-Gens und Promotor des ompA-Gens ist ungefähr 190 Bp lang. Im Verlaufe der Evolution haben daher auf chromosomaler Ebene keine Umorganisierungen im Bereich dieser beiden Gene stattgefunden.

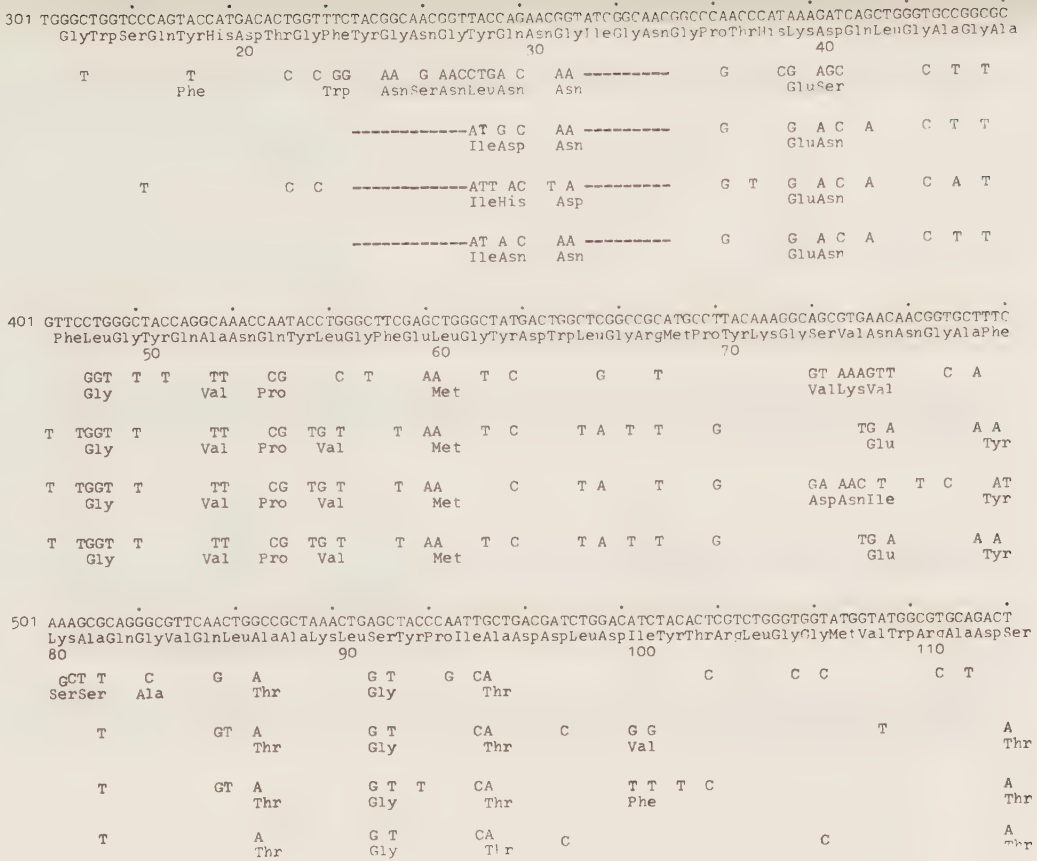
3.5.1. Nukleotidsequenzen der ompA-Gene von Shigella, Enterobacter und Serratia

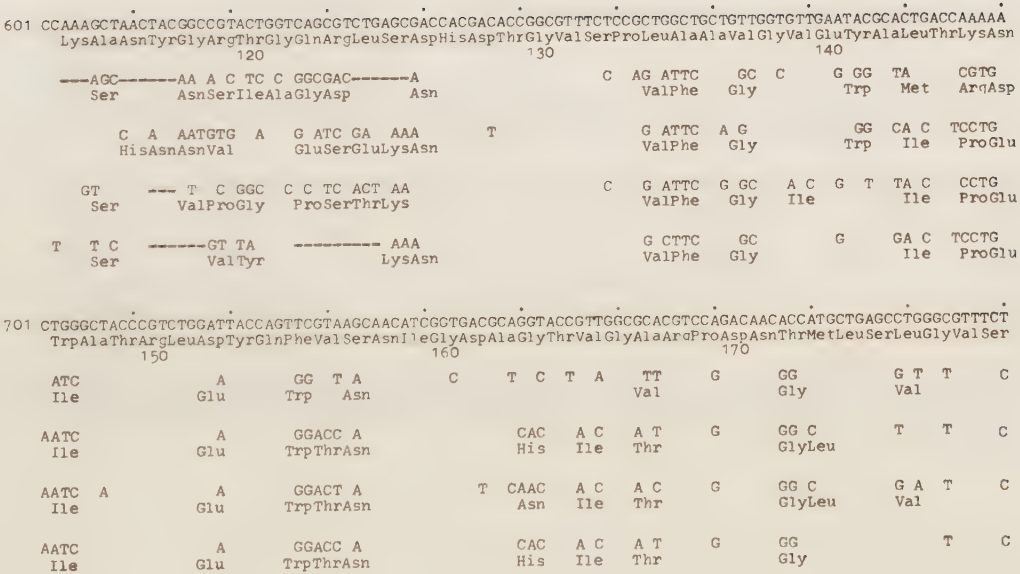
Die in dieser Arbeit ermittelten ompA-Sequenzen sind zusammen mit den Sequenzen des E. coli ompA-Gens (8) und Salmonella ompA-Gens (57) in Abb. 15 vergleichend aufgeführt.

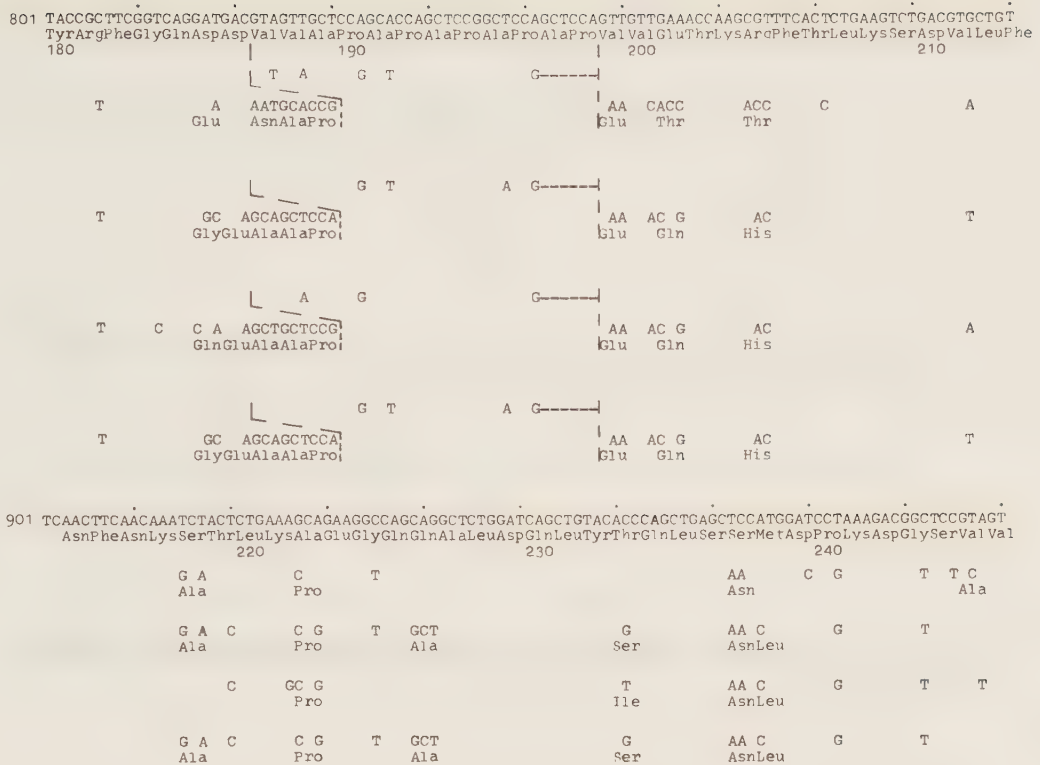
Abb. 15: Nukleotidsequenz des ompA-Gens von Serratia mit abgeleiteter Primärstruktur des Proteins

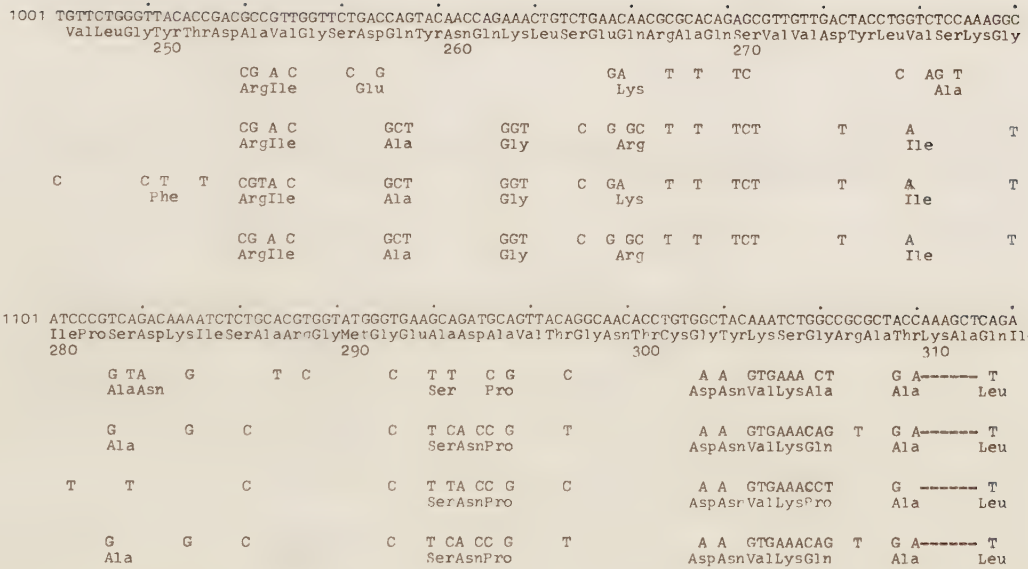
Die Nukleotide, die in dem ompA-Gen von Enterobacter und Shigella verändert vorliegen, sind angegeben, ebenso die daraus resultierenden Änderungen in der Proteinsequenz. Zum weiteren Vergleich sind die Unterschiede zum Salmonella ompA- und E. coli ompA-Gen angegeben. Positionen mit Deletionen (-) und Insertionen (Δ) sind dargestellt. Die Promotoren sind mit P1 und P2 markiert. Die Transcriptionsterminatoren und ihre Möglichkeit zur Sekundärstrukturbildung sind mit Pfeilen angegeben. Zwischen Aminosäureposition 186 und 187 des Serratia OmpA-Proteins sind in den Proteinen der anderen Spezies 3 zusätzliche Aminosäuren eingeschoben.

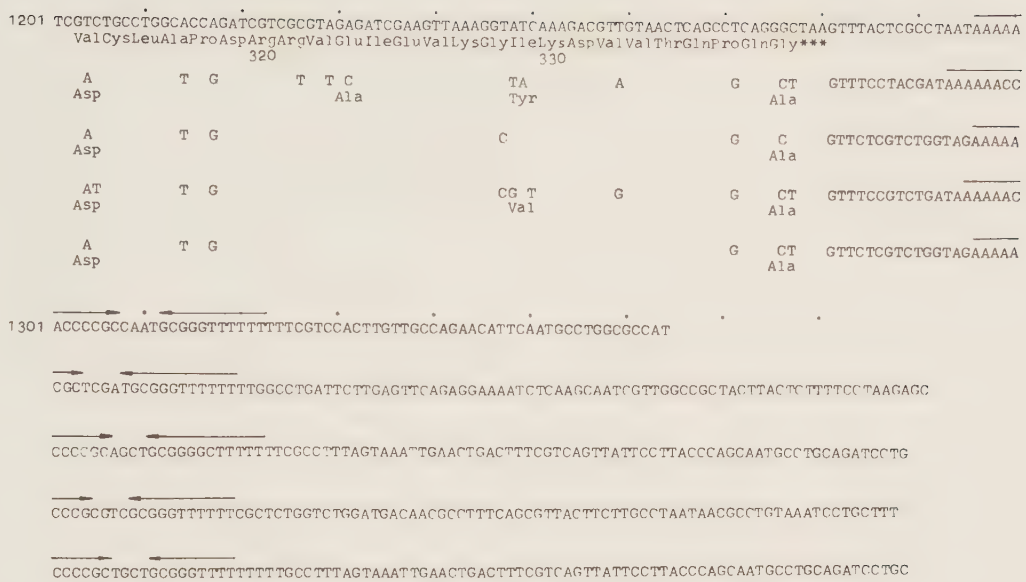

P1 -35
P2 -35
P1 -10
P2 -10
1 GCGTTTTTTTTTAGAGCCTTATCACATCACACTTGTAACTTTCGCGCCACGTTGTAGACTTTACATCGCCAAGGTTGCTCTATAACGTCAGAAAAATCGG S.marc.
CTTTTTTTTCA TGC TGACCG GT G TAA T A G G A GGC T CTGC TGT A E.aer.
CTTTTTTTTCA TGC TGACGG GT G TCAA T T G G GGCAT A C GA G T S.dys.
GTTTTTTTTCAC TGT TGACGG GT G CAA T G G AGCAT A C GT G T S.typh.
CTTTTTTTTCA TGC TGACGG GT G TCAA T G G GGCAT A C GA G T E.coli
101 CGAGTAACAAACGAGGGCTTAAACCTTGGCGAAGGAATTTAACCAAGGGCTTAAACAGCTTTAAAGCTCATTGCCTATTTGGATGATAACGAGGCGCAAA--
CATAGTTAACAACGA T ACGCC C- T - -GT ---AGGT TTA G CCTTCATGGCGAAT T AA
TAGAGTTAATATTGA CAGATCC C- T - -GT TTATCTCGTTGGAG TATTCATGGCGTAT AA
TAGAGTTAACTATTGA CAGATCC C- T - -GT TTATCTCGTTGGAG TATTCATGGCGTAT AA
TAGAGTTAATATTGA CAGATCC C- T - -GT TTATCTCGTTGGAG TATTCATGGCGTAT AA
201 ATGAAAAAGACAGCTATCGCATTAGCAGTGGCACTGGCAGGTTTCGCTACCGTAGCGCAAGCCGCTCCAAAAGATAACACCTGGTACACCGGTGCTAAAC
MetLysLysThrAlaIleAlaLeuAlaValAlaLeuAlaGlyPheAlaThrValAlaGlnAlaAlaProLysAspAsnThrTrpTyrThrGlyAlaLysLeu
-20 -10 -1 +1 10
GA T T C G G G A G
Ile Ala Gly
GA TA T G G T
IleThr
GA T T G G G T
Ile Ala
GA T T G G T
Ile


301 TGGGCTGGTCCCAGTACCATGACACTGGTTTCTACGGCAACGGTTACCAGAACGGTATCGGCAACGGCCCAACCCATAAAGATCAGCTGGGTGCCGGCGC
GlyTrpSerGlnTyrHisAspThrGlyPheTyrGlyAsnGlyTyrGlnAsnGlyIleGlyAsnGlyProThrHisLysAspGlnLeuGlyAlaGlyAla
20
30
40
401 GTTCCTGGGCTACCAGGCAAACCAATACCTGGGCTTCGAGCTGGGCTATGACTGGCTCGGCCGCATGCCTTACAAAGGCAGCGTGAACAACGGTGCTTTC
PheLeuGlyTyrGlnAlaAsnGlnTyrLeuGlyPheGluLeuGlyTyrAspTrpLeuGlyArgMetProTyrLysGlySerValAsnAsnGlyAlaPhe
50
60
70
501 AAAGCGCAGGGCGTTCAACTGGCCGCTAAACTGAGCTACCCAATTGCTGACGATCTGGACATCTACACTCGTCTGGGTGGTATGGTATGGCGTGCAGACT
LysAlaGlnGlyValGlnLeuAlaAlaLysLeuSerTyrProIleAlaAspAspLeuAspIleTyrThrArgLeuGlyGlyMetValTrpArgAlaAspSer
80
90
100
110


601 CCAAAGCTAACTACGGCCGTACTGGTCAGCGTCTGAGCGACCACGACACCGGCGTTTCTCCGCTGGCTGCTGTTGGTGTTGAATACGCACTGACCAAAAA
LysAlaAsnTyrGlyArgThrGlyGlnArgLeuSerAspHisAspThrGlyValSerProLeuAlaAlaValGlyValGluTyrAlaLeuThrLysAsn
120
130
140
---AGC------AA A C TC C GGCGAC------A C AG ATTC GC C G GG TA CGTG
Ser AsnSerIleAlaGlyAsp Asn ValPhe Gly Trp Met ArgAsp
C A AATGTG A G ATC GA AAA T G ATTC A G GG CA C TCCTG
HisAsnAsnVal GluSerGluLysAsn ValPhe Gly Trp Ile ProGlu
GT --- T C GGC C C TC ACT AA C G ATTC G GC A C G T TA C CCTG
Ser ValProGly ProSerThrLys ValPhe Gly Ile Ile ProGlu
T T C ------GT TA --------- AAA G CTTC GC G GA C TCCTG
Ser ValTyr LysAsn ValPhe Gly Ile ProGlu
701 CTGGGCTACCCGTCTGGATTACCAGTTCGTAAGCAACATCGGTGACGCAGGTACCGTTGGCGCACGTCCAGACAACACCATGCTGAGCCTGGGCGTTTCT
TrpAlaThrArgLeuAspTyrGlnPheValSerAsnIleGlyAspAlaGlyThrValGlyAlaArgProAspAsnThrMetLeuSerLeuGlyValSer
150
160
170
ATC A GG T A C T C T A TT G GG G T T C
Ile Glu Trp Asn Val Gly Val
AATC A GGACC A CAC A C A T G GG C T T C
Ile Glu TrpThrAsn His Ile Thr GlyLeu
AATC A A GGACT A T CAAC A C A C G GG C G A T C
Ile Glu TrpThrAsn Asn Ile Thr GlyLeu Val
AATC A GGACC A CAC A C A T G GG T C
Ile Glu TrpThrAsn His Ile Thr Gly


801 TACCGCTTCGGTCAGGATGACGTAGTTGCTCCAGCACCAGCTCCGGCTCCAGCTCCAGTTGTTGAAACCAAGCGTTTCACTCTGAAGTCTGACGTGCTGT
TyrArgPheGlyGlnAspAspValValAlaProAlaProAlaProAlaProAlaProValValGluThrLysArgPheThrLeuLysSerAspValLeuPhe
180
190
200
210
901 TCAACTTCAACAAATCTACTCTGAAAGCAGAAGGCCAGCAGGCTCTGGATCAGCTGTACACCCAGCTGAGCTCCATGGATCCTAAAGACGGCTCCGTAGT
AsnPheAsnLysSerThrLeuLysAlaGluGlyGlnGlnAlaLeuAspGlnLeuTyrThrGlnLeuSerSerMetAspProLysAspGlySerValVal
220
230
240


1001 TGTTCTGGGTTACACCGACGCCGTTGGTTCTGACCAGTACAACCAGAAACTGTCTGAACAACGCGCACAGAGCGTTGTTGACTACCTGGTCTCCAAAGGC
ValLeuGlyTyrThrAspAlaValGlySerAspGlnTyrAsnGlnLysLeuSerGluGlnArgAlaGlnSerValValAspTyrLeuValSerLysGly
250
260
270
ArgIle
Glu
Lys
Ala
ArgIle
Ala
Gly
Arg
Ile
Phe
ArgIle
Ala
Gly
Lys
Ile
ArgIle
Ala
Gly
Arg
Ile
1101 ATCCCGTCAGACAAAATCTCTGCACGTGGTATGGGTGAAGCAGATGCAGTTACAGGCAACACCTGTGGCTACAAATCTGGCCGCGCTACCAAAGCTCAGA
IleProSerAspLysIleSerAlaArgGlyMetGlyGluAlaAspAlaValThrGlyAsnThrCysGlyTyrLysSerGlyArgAlaThrLysAlaGlnIle
280
290
300
310
AlaAsn
Ser
Pro
AspAsnValLysAla
Ala
Leu
Ala
SerAsnPro
AspAsnValLysGln
Ala
Leu
SerAsnPro
AspAsnValLysPro
Ala
Leu
Ala
SerAsnPro
AspAsnValLysGln
Ala
Leu


1201 TCGTCTGCCTGGCACCAGATCGTCGCGTAGAGATCGAAGTTAAAGGTATCAAAGACGTTGTAACTCAGCCTCAGGGCTAAGTTTACTCGCCTAATAAAAA
ValCysLeuAlaProAspArgArgValGluIleGluValLysGlyIleLysAspValValThrGlnProGlnGly***
320
330
A T G T T C TA A G CT GTTTCCTACGATAAAAAACC
Asp Ala Tyr Ala
A T G C G C GTTCTCGTCTGGTAGAAAAA
Asp Ala
AT T G CG T G G CT GTTTCCGTCTGATAAAAAAC
Asp Val Ala
A T G G CT GTTCTCGTCTGGTAGAAAAA
Asp Ala
1301 ACCCCGCCAATGCGGGTTTTTTTTCGTCCACTTGTTGCCAGAACATTCAATGCCTGGCGCCAT
CGCTCGATGCGGGTTTTTTTTGGCCTGATTCTTGAGTTCAGAGGAAAATCTCAAGCAATCGTTGGCCGCTACTTACTCTTTTCCTAAGAGC
CCCCGCAGCTGCGGGGCTTTTTTTCGCCTTTAGTAAATTGAACTGACTTTCGTCAGTTATTCCTTACCCAGCAATGCCTGCAGATCCTG
CCCGCGTCGCGGGTTTTTTCGCTCTGGTCTGGATGACAACGCCTTTCAGCGTTACTTCTTGCCTAATAACGCCTGTAAATCCTGCTTT
CCCCGCTGCTGCGGGTTTTTTTTTGCCTTTAGTAAATTGAACTGACTTTCGTCAGTTATTCCTTACCCAGCAATGCCTGCAGATCCTGC

3.5.2. Analyse der DNA-Sequenzen

3.5.2.1. Ausmaß der Homologien der ompA-Gene in der Gruppe der Enterobacteriaceae

Beim Vergleich der ermittelten Sequenzen mit der Nukleinsäuresequenz des E. coli ompA-Strukturgens läßt sich bei Serratia 77,5 %, bei Enterobacter 85 % und bei Shigella 96 % Homologie errechnen. Diese Daten bestätigen die in Kap. 3.1.4. dargestellte Interpretation der Signalstärke der DNA:DNA-Hybridisierung mit dem E. coli-Gen als Probe:

E. coli → Shigella > Salmonella > Enterobacter > Serratia

Viele Sequenzunterschiede erscheinen in der Wobble-Position eines Codons. Bei Serratia bleiben 32,5 % der Austausche stumm, d.h. ohne Veränderung der Aminosäuresequenz. Bei Enterobacter sind 39,7 % und bei Shigella 54 % der Basenpaaraustausche stumm.

Die Strukturgene von Serratia, Enterobacter und Shigella sind jeweils größer als das von E. coli. Serratia hat 13, Enterobacter 4 und Shigella 5 Codons mehr als E. coli.

Größere Sequenzunterschiede gibt es in den nicht kodierenden Regionen der Gene von Serratia und Enterobacter. Die "Leader"-Sequenz des Serratia ompA-Gens ist 53,5 % die von Enterobacter 79 % homolog zu der des E. coli ompA-Gens. Die "Leader"-Sequenzen von Salmonella ompA und Shigella ompA sind aber erstaunlicherweise der vergleichbaren Region des E. coli ompA-Gens weit mehr homolog als ihre Strukturgene.

Für die Sequenzen, die sich an die jeweiligen Terminatorsequenzen anschließen, lassen sich für Serratia und Enterobacter kaum noch Homologien zu E. coli feststellen. Wahrscheinlich tragen daher diese Bereiche auch keine Information für spezifische physiologische Funktionen.

Tabelle 12: Vergleich des ompA-Gens von Serratia, Enterobacter, Salmonella und Shigella mit dem E. coli ompA-Gen

	S.marc.	E.aer.	S.typh.	S.dys.	E.coli
Basenpaare des Strukturgens	1077	1050	1050	1053	1038
Basenpaar-Insertionen	39	12	12	15	
Gesamtzahl der Basenpaar-Austausche	194	141	96	26	
Gesamtzahl der betroffenen Codons	130	99	75	21	
Stumme Austausche/ betroffene Codons	63/60	56/54	52/52	14/14	
% stumme Austausche	32,5 %	39,7 %	54,2 %	54 %	
P2-Promotor-Homologie	100 %	100 %	100 %	100 %	
Homologie der Leader-Sequenz	53,5 %	79 %	96,5 %	100 %	
Homologie des Strukturgens	77,5 %	85 %	89,5 %	96 %	
Anzahl der Aminosäuren	359	350	350	351	346
Austausche von Aminosäuren	70	45	23	7	
Homologie der Proteinprimär-struktur	74 %	83,5 %	86 %	92 %	

3.5.2.2. Promotor- und "Leader"-Sequenz

In Shigella, Salmonella und E. coli findet man in der regulatorischen Sequenz ihrer Gene jeweils 2 mögliche Promotor-Bereiche. Diese überlappende Anordnung zweier Promotoren kann in Enterobacter und Serratia nicht gefunden werden. Hier ist der mögliche P1-Promotor stark abgeändert. Für E. coli wurde gezeigt, daß im zellfreien System sowohl P1 als auch P2 aktiv sind, wobei mehr m-RNA von P2 ausgehend synthetisiert wird, d.h. Transcriptionsinitiation fast ausschließlich an P2 (36) erfolgt. Die Promotor-Sequenzen P2 von Shigella, Enterobacter und Serratia sind identisch mit der von E. coli und Salmonella und stimmen gut mit der generalisierten Sequenz für Promotoren überein (160,171). Die bei allen untersuchten Genen konservierte P2-Region ist somit ein Hinweis, daß der P2-Promotor auch in der Zelle benützt wird.

Wenn, von P2 ausgehend, die Transcriptionsinitiation mit der gleichen Spezifität wie bei E. coli erfolgt (36), besteht das unübersetzte 5'-Ende der m-RNA von Serratia und Shigella aus 134, das von Enterobacter aus 131 Nukleotiden. Auffallend ist, daß, während bei allen anderen Genen 5 Adenine vor dem Translations-Initiations-Codon stehen, es bei Serratia nur 3 Adenine sind. Damit verkürzt sich die Strecke zwischen der Ribosomenbindungsstelle der m-RNA und dem Startcodon bei Serratia um 2 auf 6 Nukleotide.

Die Austausche von Enterobacter erstrecken sich über 2 Sequenzbereiche (70. Bp - 123. Bp und 145. Bp - 177. Bp) (Abb. 15), wo auch für Serratia starke Sequenzvarianzen im Vergleich mit E. coli auftreten. Serratia zeigt in diesen Bereichen keine Homologie zu E. coli.

Durch Vergleich der Promotor- und "Leader"-Sequenzen aller 5 ompA-Gene gewinnt man folgendes Bild. Perfekte Homologie erstreckt sich über die P2-RNA-Polymerase-Bindungsstelle und in Promotor-distaler Richtung laufend bis über den Transcriptionsinitiationspunkt bis Basenpaar 70 (gezählt bei der Serratiasequenz). Stark konserviert findet man einen 22 Basenpaar-Abschnitt (123 - 145) und den Bereich 23 Ba-

senpaare vor dem jeweiligen Startcodon der Strukturgene. In beiden konservierten Bereichen findet sich bei allen Genen 2 Shine-Dalgarno-Sequenzen (Position 132-136 und 191-195). Es gibt aber keine Hinweise darauf, ob beide Sequenzen als Ribosomenbindungsstellen benützt werden und wie man annehmen könnte, ob zwischen der ersten und zweiten Bindungsstelle ein kurzes Peptid produziert wird (124).

3.5.2.3. Die Strukturgene

In Anlehnung an die schon bekannte Nukleinsäuresequenz des E. coli ompA-Gens (8) und die Aminosäuresequenz des OmpA-Proteins (29) war es leicht, die jeweiligen Leseraster der entsprechenden Gene von Serratia, Enterobacter und Shigella zu finden. Die von der DNA-Sequenz abgeleitete Aminosäuresequenz des E. coli Proteins stimmte ab Aminosäure 22 mit der von Chen bestimmten Aminosäuresequenz überein. Die Signalsequenz ist also 21 Aminosäuren lang.

Die Sequenz, die für das Signalpeptid und die ersten 23 Aminosäurereste aller hier untersuchten ompA-Gene codiert, ist stark konserviert. Es kommt in diesem Bereich im wesentlichen zu Basenpaaraustauschen in der Wobble-Position oder zu Austauschen, die nur Aminosäure-Substitutionen zur Folge haben, die den Charakter des Proteins nicht verändern dürften.

Sehr starke Veränderungen erfolgten in dem Sequenzabschnitt der Basenpositionen 332-365, die zu drastischen Unterschieden der Aminosäurenfolge zwischen Position 23 und 34 führen. Diese 33 Bp-Sequenz von Serratia wird in Enterobacter, Shigella, Salmonella und E. coli nicht gefunden und die entsprechende 24 Bp-Region von Enterobacter und 12 Bp-Region von Shigella, Salmonella und E. coli zeigen nur wenig Ähnlichkeit.

Basenpaaränderungen häufen sich auch in Sequenzabschnitt 602-641 (Aminosäuren 113-126, Numerierung bei Serratia). In diesem Bereich ging Enterobacter und E. coli die Kodierungskapazität für 5 und Salmonella für 1 Aminosäure verloren. Die Shigella-Sequenz zeigt keine Deletionen, hat aber wie die restlichen Sequenzen von Enterobacter (24 Bp), E. coli (24 Bp) und Salmonella (36 Bp) keine Ähnlichkeit zu Serratia.

Weiter in Richtung 3'-Ende bis zum Stopp-Codon (ungefähr 640 Bp) sind E. coli, Shigella und Salmonella aber stark homolog.

Nach der Nukleotidposition 822 besitzen Enterobacter, Shigella, Salmonella und E. coli eine 9 Basenpaare für X-Ala-Pro (X steht für eine jeweils andere Aminosäure in den verschiedenen OmpA-Proteinen) kodierende Region, die bei Serratia fehlt. Dafür fehlen die Nukleotide 852-858 bei ihnen, und Serratia hat hier eine Nukleotidfolge, kodierend für Ala-Pro.

In dem restlichen Sequenzabschnitt konzentrieren sich Veränderungen zwischen Position 1167-1199 (Numerierung der Nukleotidfolge beim Serratia ompA - Gen). Alle 4 Gene unterscheiden sich in gleicher Weise von dem Serratia-Gen. Ihnen fehlen 6 Basenpaare und die jeweils verbleibende Sequenzfolge läßt sich mit Serratia nicht mehr vergleichen.

3.5.2.4. Sekundärstrukturen der m-RNA

Anschließend an das Stopp-Signal für die Translation finden sich bei allen Genen Sequenzabschnitte mit ausgeprägter Symmetrie, die es den entsprechenden m-RNA's erlauben sollte, stabile "stem"- und "loop"-Strukturen auszubilden (s. Abb. 15). Die nach (187) berechneten freien Energien sind für den Transcriptions-Terminator des Shigella ompA-Gens $\Delta G = -22,2$ und des Enterobacter- und Serratia-Gens jeweils $\Delta G = -18,4$.

Bemerkenswert ist, daß Möglichkeiten zur Sekundärstrukturbildung auch in den Abschnitten aller ompA-m-RNA's gegeben sind, wo sie sich stark unterscheiden (s. Abb. 15, Basenpaar 594-665, gezählt bei der Serratia-Sequenz).

3.5.2.5. Codon-Benützung

Die Analyse der Codons, die für die Translation der ompA-m-RNA von Serratia, Enterobacter, Shigella, Salmonella und E. coli benützt werden, ist in Tab. 13 dargestellt. Wie schon für E. coli (8) und Salmonella (57) gezeigt und hier vergleichsweise aufgeführt, werden von mehreren möglichen synonymen Codons manche mit gewissem Vorzug benützt. In der vorkommenden Häufigkeit von Codons folgen die anderen Enterobacteriaceae dem Muster von E. coli. In allen 5 ompA-m-RNA's sind 15 der 61 möglichen Sinncodons nicht anzutreffen.

Ikemura bestimmte quantitativ das relative Vorkommen der verschiedenen t-RNA-Spezies in E. coli (85,86). Die Translation eines Codons, dessen t-RNA in der Zelle nur wenig vorkommt, erfordert mehr nicht-spezifische Codon-t-RNA-Wechselwirkungen, bis die richtige t-RNA "paßt", als die Translation eines Codons, dessen t-RNA zu den Haupt-t-RNA's der Zelle gehört (62). Die untersuchten Gene zeigen die starke Tendenz, Codons zu benützen, die von den t-RNA's übersetzt werden, die unter den Isoakzeptoren am häufigsten vorkommen. Das wurde schon in Genen für andere in großen Mengen vorkommenden Proteine wie dem Lipoprotein (132) und den ribosomalen Proteinen (152) beobachtet. Diese Codonbenützung zusammen mit der Langlebigkeit der ompA-mRNA (58) ist sicherlich ein regulatorisches Moment, die die starke Ausprägung der Gene erlaubt.

Tabelle 13: Benützte Codons in den ompA mRNA's von S. marc. : E. aero. : S. dys. : S. typh. : E. coli (Die Reihenfolge entspricht der in der Tabelle)

	U		C		A		G	
U	UUUPhe	0: 0: 2: 3: 2	UCUSer	8: 6: 5: 9: 4	UAUTyr	1: 2: 1: 5: 2	UGUCys	1: 1: 1: 1: 1
	UUCPhe	10:10: 7: 8: 7	UCCSer	5: 6: 7: 6: 8	UACTyr	18:13:14:10:15	UGCCys	1: 1: 1: 1: 1
	UUALeu	1: 0: 1: 1: 1	UCASer	1: 0: 0: 0: 0	UAAOch	1: 1: 1: 1: 1	UGAOpa	0: 0: 0: 0: 0
	UUGLeu	0: 0: 2: 1: 0	UCGSer	0: 0: 0: 0: 0:	UAGAmb	0: 0: 0: 0: 0	UGGTrp	5: 7: 6: 5: 5
C	CUULeu	0: 0: 0: 0: 0	CCUPro	3: 1: 1: 3: 1	CAUHis	2: 1: 2: 2: 2	CGUArg	9: 9:10:10:10
	CUCLeu	1: 2: 0: 0: 0	CCCPro	0: 0: 0: 0: 0	CACHis	1: 2: 4: 3: 3	CGCArg	5: 4: 3: 2: 3
	CUALeu	0: 0: 0: 0: 0	CCAPro	9: 3: 3: 2: 3	CAAGln	4: 0: 1: 2: 2	CGAArg	0: 0: 0: 0: 0
	CUGLeu	26:21:21:21:22	CCGPro	3:14:15:17:15	CAGGln	18:17:16:16:15	CGGArg	0: 0: 0: 0: 0
A	AUUIle	1: 1: 1: 3: 1	ACUThr	6: 4: 9: 7:10	AAUAsn	0: 2: 2: 2: 1	AGUSer	0: 0: 0: 0: 0
	AUCIle	9:11:14:14:15	ACCThr	14:17:13:15:12	AACAsn	15:19:17:16:18	AGCSer	7: 7: 4: 2: 4
	AUAIle	0: 0: 0: 0: 0	ACAThr	2: 1: 3: 1: 1	AAALys	19:15:15:15:15	AGAArg	0: 0: 0: 0: 0
	AUGMet	6: 8: 5: 5: 6	ACGThr	0: 0: 0: 0: 0	AAGLys	3: 4: 4: 5: 4	AGGArg	0: 0: 0: 0: 0
G	GUUVal	17:17:17:12:17	GCUAla	18:25:21:22:22	GAUAsp	9: 5: 6: 9: 5	GGUGly	19:17:25:16:24
	GUCVal	2: 2: 0: 2: 1	GCCAla	4: 2: 3: 3: 1	GACAsp	17:19:17:16:17	GGCGly	22:20:13:22:14
	GUAVal	7: 9: 7:10: 7	GCAAla	16: 8:11: 7:11	GAAGlu	6: 8:12: 9:10	GGAGly	0: 0: 0: 0: 0
	GUGVal	3: 2: 4: 3: 2	GCGAla	3: 4: 2: 3: 3	GAGGlu	2: 3: 3: 3: 3	GGGGly	0: 0: 0: 0: 0

3.6. Eigenschaften der Primärstruktur der OmpA-Proteine

Nach den aus den Nukleotidsequenzen abgeleiteten Primärstrukturen der Proteine hat das Shigella pro-OmpA-Protein 351 Reste mit dem errechneten Molekulargewicht von 37 729. Das Enterobacter pro-OmpA besitzt 350 Reste und das Molekulargewicht 37 533, und das pro-OmpA-Protein von Serratia ist mit 359 Resten und dem Molekulargewicht 38 383 das größte Protein.

Nach Abspaltung des jeweils 21 Aminosäuren langen Signalpeptids zwischen zwei Alanin-Resten (siehe andere Signalsequenzen, auch bei ihnen erscheint Alanin an der Spaltstelle, 44) betragen die Molekulargewichte der reifen Proteine von Shigella 35 773, von Enterobacter 35 507 und von Serratia 36 357.

Somit stimmt das für das Shigella OmpA-Protein über Polyacrylamidgel gefundene relative Molekulargewicht sehr gut, während sowohl für das Enterobacter OmpA-Protein als auch für das Serratia OmpA-Protein ein wesentlich kleineres Molekulargewicht über Polyacrylamidgel bestimmbar ist (34 000 und 34 500).

Diese Ergebnisse sind ähnlich wie bei E. coli, dessen OmpA-Protein mit einem wahren Molekulargewicht von 35 159 nur entsprechend einem Molekül mit dem Molekulargewicht 33 000 läuft. Dieses Phänomen kann nicht mit einer überwiegend negativen Ladung der Proteine erklärt werden, denn genau umgekehrt besitzt das Serratia OmpA-Protein eine Nettoladung von 5 positiv geladenen Resten. Bei Enterobacter, Shigella und Salmonella ist die jeweilige Zahl positiv und negativ geladener Aminosäuren gleich.

Wie in Tabelle 12 vergleichend mit E. coli aufgeführt ist, zeigt Serratia 70 Aminosäureaustausche und 13 Einschübe, und somit ist das reife Protein zu 77,5 % homolog zum E. coli OmpA-Protein. Das Enterobacter OmpA-Protein zeigt 45 ausgetauschte und 4 eingeschobene Aminosäuren. Homologie besteht zu 85 %. Das Shigella OmpA-Protein ist um 5 Reste größer

und hat 7 Austausche, was heißt, daß es zu 96 % homolog ist. In allen Fällen sind die meisten Austausche Ersatz von strukturell ähnlichen Resten und haben konservativen Charakter.

Die OmpA-Signalsequenzen sind untereinander stark homolog. Vergleicht man sie mit Signalpeptidsequenzen anderer äußerer Membranproteine und periplasmatischer Proteine (121), so findet man nur wenig Homologie.

Die OmpA-Signalsequenzen haben wie die anderen Proteine eine positiv geladene basische NH_2-terminale Region (2 Lys-Reste) anschließend gefolgt von hydrophoben, überwiegend Ala-Resten.

Beim Vergleich der reifen OmpA-Proteine fallen drastische Unterschiede in 4 Regionen auf. Diese Regionen werden im folgenden entsprechend der Aminosäureposition in der E. coli OmpA Sequenz mit Region "25", "70" und "110" bezeichnet.

Um Aminosäureposition "25" sind die E. coli, Salmonella und Shigella OmpA-Proteine sehr unterschiedlich, lassen sich aber dem von Enterobacter und Serratia gegenüberstellen, da Enterobacter und Serratia hier jeweils Reste eingeschoben haben. Enterobacter hat hier 4 polare Aminosäuren und Serratia 7 Aminosäuren mehr als E. coli. Um die Position "70" sind die Sequenzen des E. coli und Shigella OmpA-Proteins von Ser-Val-Glu bei Serratia in Ser-Val-Asn abgeändert, das OmpA-Protein von Enterobacter zeigt die Sequenz Val-Lys-Val und Salmonella Asp-Asn-Ile. Der Sequenzabschnitt um Position "110" fällt dadurch auf, daß keines der Proteine irgendwelche Ähnlichkeit mit den anderen zeigt. Enterobacter hat keine zusätzlichen Reste, ist aber sehr verschieden von E. coli. Shigella und Serratia haben je 5 Reste, Salmonella 4 Reste mehr als E. coli.

Im CO_2H-terminalen Teil der Proteine gibt es nur zwischen den 2 Cys-Resten in Position 301 und 315 größere Unterschiede. Im Vergleich mit dem Serratia-Protein haben Enterobacter, Shigella, Salmonella und E. coli hier 2 Aminosäuren verloren.

Tabelle 14: Veränderungen der OmpA-Proteine auf molekularer Ebene im Vergleich mit dem E. coli OmpA und ihre qualitativen Eigenschaften.
(Vereinfachte qualitative Darstellung von Tab. 11)

	Veränderungen der Proteine in den Positionen			Eigenschaften der in E. coli ausgeprägten OmpA-Proteine					Konjugation
	"25"	"70"	"110"	K3	Ox2	ColK	ColL	4-59	
E. coli	-	-	-	+	+	+	+	-	+
S. dys.	v	-	Add.	-	+	+	-	+	+
S. typh.[1)]	v	v	Add.	-	+	+	+	+	+
E. aer.	Add.	v	v	-	-	-	+	-	-
S. marc.	Add.	v	Add.	-	-	-	-	-	-
Hybrid[2)] E.coli/S.dys.	-	-	Add.	-	+	+	-	+	n.t.

[1)] Ref. 57

[2)] Hybridprotein mit den Aminosäuren 1-44 von E. coli und 45-232 von Shigella Ligiert wurde das Shigella HpaI-BamHI Fragment aus pTU3Sh in pTU201 (23). Dieses Hybridgen wird in einem Amber-Suppressor-Stamm exprimiert, das Produkt wird in die Membran eingelagert und zeigt die oben erwähnten Eigenschaften (Cole, unveröffentlichte Daten)

V = Primärstruktur des Proteins ist verändert
Add. = Eingeschobene Aminosäuren
- = keine Veränderung; + = empfindlich; n.t. = nicht getestet

Auffallend ist, daß neben den 2 Cys-Resten in allen Proteinen auch die ^{189}Ala-Pro-Ala-Pro-Ala-Pro-Ala-Pro^{196} Region konserviert blieb.

4. DISKUSSION

Die Ausprägung der ompA-Gene

Die zu starke Ausprägung des ompA-Gens als Folge der Klonierung in ein Plasmid mit hoher Kopienzahl wurde schon in einer früheren Arbeit als für die Zelle lethal beschrieben (73). Die molekularen Vorgänge, die zu dieser Lethalität führen, sind noch unbekannt. Es erscheint möglich, daß um die in dem Modell von Blobel (15) geforderten Protein-Export-Stellen (90) der Membran bei hoher Syntheserate eine zu starke Konkurrenz der verschiedenen Ribosomen-RNA-Komplexe besteht, womit der Export anderer Proteine blockiert werden könnte.

Da auch verkürzte OmpA-Proteine von E. coli noch exportiert und in die Membran eingelagert werden (24), ist es bisher nicht gelungen, den für den NH_2-Terminus kodierende Genteil auf ein Plasmid mit hoher Kopien-Zahl zu klonieren. Es war daher erstaunlich, daß es gelang, ungefähr 2/3 des ompA-Gens von Serratia mit Promotor und der Kodierungskapazität für die ersten 238 Aminosäuren in die replikative Form des Phagen M13mp9 zu klonieren (Kap. 3.4.), dessen Menge in der Zelle einem Plasmid mit hoher Kopien-Zahl entspricht (114). Das Gen wurde ausgeprägt und das verkürzte Protein in die äußere Membran eingelagert (Kap. 3.3.3., Abb. 14). Es wird neben dem wirtseigenen OmpA-Protein aber nicht sehr stark ausgeprägt. Es ist zu erwähnen, daß die Zellen durch das Ausschleusen von M13 Phagen in großen Mengen stark geschädigt sind. Die große Phagenproduktion fordert eine sehr starke Ausprägung des M13 Hüllproteins. Es erscheint möglich, daß eine Konkurrenz zwischen Phagen-Hüllprotein und OmpA-Protein um "Exportstellen" der Membran oder um die Signalpeptidase, die das Hüllprotein, OmpA-Protein und viele andere Proteine prozessiert, besteht (206). Durch die großen Mengen auszuschleusenden Hüllproteins (M13 Phagenbil-

dung findet in der Membran statt, 70) wird der Exprot von OmpA-Protein möglicherweise kompetitiv gehemmt.

Da die Ausprägung der in pHSG415 und λNM816 klonierten ompA-Gene von Serratia, Enterobacter und Shigella in E. coli erfolgen kann und die Translokation der Proteine in die äußere Membran stattfindet, zeigt dies, daß die Merkmale der OmpA-Proteine, die von dem Protein-Export-System erkannt werden, stark konserviert sind.

Die m-RNA der ompA-Gene

Die kodierende Sequenz der ompA-Gene von Shigella, Enterobacter und Serratia hat, wie die des E. coli-Gens, ausgeprägte Symmetrieeigenschaften (Kap. 3.5.2.4.). Den entsprechenden m-RNA-Bereichen ist daher die Möglichkeit gegeben, stabile Sekundärstrukturen auszubilden. Es ist interessant, daß in den Regionen, wo die Shigella- und Enterobacter-Sequenzen sehr erheblich von der E. coli-Sequenz abweichen, ebenfalls Symmetrie gefunden werden kann. Das bedeutet, daß während der Evolution der ompA-Gene innerhalb der Enterobacteriaceae die Möglichkeit zur Bildung von Sekundärstrukturen auf m-RNA-Ebene erhalten bleibt, da sie vermutlich zu den sehr langen Halbwertszeiten beitragen (58,77), die dem Protein, in Verbindung mit der Codon-Benützung (Kap. 3.5.2.5.), die Vorteile der starken Ausprägung erhalten.

Regulatorische Region der ompA-Gene

Wie in Kap. 3.5.2.2. ausgeführt, wird mit großer Wahrscheinlichkeit der in allen ompA-Genen gleiche P2-Promotor benützt, womit die "Leader"-Sequenzen der m-RNA's alle gleich lang sein dürften (Ausnahme: Enterobacter). Da es aber sehr vie-

le Basenpaar-Änderungen in der "Leader"-Sequenz gibt - Serratia zeigt nur noch 55 % Homologie zu E. coli -, scheint sie kaum eine biologische Rolle zu spielen, und der Großteil der Sequenz erscheint völlig unbedeutend für die Ausprägung des Proteins.

Warum die zweite Ribosomenbindungsstelle (Kap. 3.5.2.2.) neben der ersten vor dem Startcodon konserviert blieb, ist unbekannt. Möglicherweise spielt sie bei Serratia eine Rolle, da hier der Abstand zwischen der ersten Shine-Dalgarno-Sequenz und dem Startcodon der Translation um 2 Nukleotide verkürzt ist. Würde auf diese Weise der m-RNA-Ribosomenkomplex sterisch die Bindung der ^{Met}t-RNA erschweren, könnte auch die zweite Ribosomenbindungsstelle benützt werden. Eine andere, sehr hypothetische und nicht zu beantwortende Frage ist, ob die Gene früher vielleicht größer gewesen sind. Das würde z.B. bei Serratia bedeuten, daß die Sequenzfolge AAG (Position 145) 8 Nukleotide hinter der zweiten Ribosomenbindungsstelle einmal das Startcodon AUG gewesen sein könnte.

Korrelation zwischen Funktion und molekularer Struktur der OmpA-Proteine

Das OmpA-Protein von E. coli zeigt eine Zwei-Domänen-Konfiguration, wobei die 170 NH_2-terminalen Aminosäure-Reste den eigentlichen Membranteil des Proteins darstellen, während die 155 CO_2H-terminalen Reste ins Periplasma reichen (24, 168). Vergleicht man die Primärstrukturen der OmpA-Proteine von E. coli, Shigella, Salmonella, Enterobacter und Serratia in diesem Bereich der 170 NH_2-terminalen Reste, so findet man 3 "variable Regionen" bei Aminosäureposition "25", "70" und "110" (bezogen auf die E. coli-Sequenz), wo die Proteine jeweils mehr oder weniger starke Veränderungen erfahren haben. Alle fünf Proteine sind in mindestens zwei dieser Regionen von Veränderungen betroffen.

Die entsprechenden Bereiche auf den Genen scheinen sogenannte "hot spots" für genetische Variationen darzustellen. Welche Regionen der einzelnen OmpA-Proteine betroffen sind und in welcher Weise und welchen Einfluß diese Veränderungen auf ihre Eigenschaften nehmen, ist in Tabelle 14 dargestellt.

Die NH_2-terminalen Bereiche der OmpA-Proteine (bis Aminosäure 177) zeigen keinen stark hydrophoben Charakter. Die zusätzlichen vier Aminosäuren beim Enterobacter OmpA-Protein in Position "25" haben alle polaren Charakter. Das gilt auch überwiegend für die in Position "110" eingeschobenen Aminosäuren bei Serratia, Shigella und Salmonella.

Die Eigenschaft eines Proteins als Phagenrezeptor beinhaltet, daß es teilweise an der Außenseite der Zelle exponiert sein muß. Was die Hydrophobizität der Proteine in den genannten Bereichen betrifft, scheint dies durchaus ermöglicht. Für den Bereich um Aminosäureposition "70" wurde bereits gezeigt, daß er offenbar exponiert ist (37).

Region "70" und "110"

Bereiche des OmpA-Proteins von E. coli um Position "70" oder "110" sind offensichtlich für die Infektion durch den Phagen K3 von Bedeutung (37). Inzwischen wurden in unserem Labor einige K3-resistente E. coli Mutanten isoliert und Teile ihrer ompA-Gene sequenziert (Morona, unveröffentlichte Daten). Sie zeigen alle Veränderungen in den Sequenzabschnitten, die für die Proteinregion "70" oder "110" kodieren.

Die Adsorption von K3 erfolgt nicht über die Region "25" wie das Hybridgen, das die für Region "25" kodierende Sequenz des E. coli-Gens und die für Region "70" und "110" kodierende Sequenz des Shigella-Gens trägt (siehe Legende zu Tabelle 14), zeigt. Wäre diese Region "25" für die Infektion von K3 verantwortlich, müßte der Träger des Hybridproteins genau wie E. coli gegen K3 empfindlich sein. Da das

Hybridprotein die veränderte Region "110" aber die dem E. coli-Protein gleiche Region "70" des Shigella-Proteins besitzt, wäre es möglich, daß Region "110" des Shigella-Proteins die Adsorptionsfähigkeit verloren hat und Infektion über Region "70" nicht mehr erfolgen kann.

Die OmpA-Proteine von Salmonella, Enterobacter und Serratia sind im Vergleich zu E. coli alle in Position "70" verändert und gegen K3 resistent.

Zu den unphysiologischen Eigenschaften der multifunktionellen OmpA-Proteine zählen auch in einer noch unbekannten Weise deren Funktion bei der Aufnahme von Colicin L und K, ohne daß sie den spezifischen Rezeptor für sie darstellen (26). Daher ist es vielleicht erforderlich, daß das OmpA-Protein mit anderen für die Colicin-Aufnahme erforderlichen Komponenten (vielleicht direkt dem Colicin-Rezeptor) in der äußeren Membran in Kontakt steht. Für diese Funktion würden unveränderte Kontaktseiten im OmpA-Protein und der anderen Komponente benötigt.

Bei der Colicin L-Aufnahme scheinen die Regionen "70" und "110" wichtig zu sein. Eine ompA-Mutante von E. coli, die eine Tandem-Duplikation in ihrem ompA-Gen aufweist, die zu Aminosäureeinschüben um Position "70" führte, war unempfindlich gegen Colicin L (37). Eine andere ompA-Mutante von E. coli, bei der der Gly-Rest in Position "70" gegen ein Arg ausgetauscht ist, zeigt, verglichen mit dem Wildtyp, verstärkte Empfindlichkeit gegenüber Colicin L (37). Das Enterobacter OmpA-Protein hat kein Arg um Position "70", aber in Position 74 (nach Numerierung bei Serratia Abb. 15) einen Lys-Rest, der im E. coli OmpA-Protein nicht vorkommt. Es ist möglich, daß diese Besonderheit E. coli, wenn es das Enterobacter OmpA-Protein in seiner äußeren Membran trägt, eine größere Empfindlichkeit gegenüber Colicin L verleiht (Tab. 11). Enterobacter selbst aber ist unempfindlich gegenüber Colicin L. Da Enterobacter fähig ist, eine Kapsel zu bilden (12), kann das Colicin L möglicherweise seinen Rezeptor auf der Zelle nicht mehr erreichen oder Enterobac-

ter hat keinen Rezeptor für Colicin L.
Das E. coli OmpA-Protein und das Shigella OmpA-Protein sind in Position "70" identisch. Das E. coli OmpA-Protein vermittelt im Gegensatz zum Shigella OmpA-Protein Colicin L-Empfindlichkeit, wozu das Shigella OmpA-Protein möglicherweise durch seine stark abgeänderte Position "110" nicht mehr fähig ist.

Region "25"

Empfindlichkeit gegenüber dem Phagen Ox2 wird wie bei E. coli auch noch bei Shigella und Salmonella gefunden. Als mögliche Vermittlung der Ox2-Empfindlichkeit könnte die Region "25" zur Diskussion stehen. Die nur kleinen Variationen bei Shigella, Ile-Asp-Asn-Asn statt Ile-Asn-Asn-Asn bei E. coli und Ile-His-Asn-Asp bei Salmonella, führen hier vielleicht nicht wie beim OmpA-Protein von Enterobacter und Serratia zur Phagen-Resistenz. Deren OmpA-Proteine haben durch zusätzliche Aminosäuren in diesem Bereich starke Veränderungen erfahren und damit vielleicht auch die Rezeptoreigenschaften für Ox2 und dessen Wirtsbereichsmutanten (Tab. 11), die kleinere Rezeptorvarianzen möglicherweise noch hätten erkennen können. Vielleicht wird aber durch diese Aminosäureeinschübe die Möglichkeit des zur Phageninfektion eventuell nötigen Zusammenwirkens mit anderen Membran-Komponenten verhindert.

Die Region "110" kann man als möglichen Rezeptor für Ox2 wohl ausschließen, da alle Proteine, auch die von Shigella und Salmonella, beide empfindlich gegen Ox2, im Vergleich mit dem E. coli OmpA-Protein Insertionen aufweisen.

Die Eigenschaft der Colicin K-Empfindlichkeit scheint mit der Ox2-Empfindlichkeit gekoppelt zu sein (Tab. 14). Daher könnte der Bereich um Position "25" eine erforderliche Kontaktstelle zur Vermittlung der Colicin K-Empfindlichkeit darstellen.

Die Zugehörigkeit unterschiedlicher Funktionen zu einer Domäne des OmpA hat auch Manoil (113) bei der phänotypischen Charakterisierung von verschiedenen OmpA-Mutanten gefunden. Seine Ergebnisse zeigen ebenfalls, daß die Domäne, die die Colicin K-Empfindlichkeit vermittelt, auch für die Ox2-Infektion benötigt wird. Nach seinen und den hier gewonnenen Ergebnissen muß diese Domäne auch für die Konjugation wichtig sein. Danach sollte in Region "25" des OmpA die Funktion für die Konjugation liegen.

Region "110"

Das OmpA-Protein von Salmonella stellt den Rezeptor für das Bacteriocin 4-59 dar (57, 182). Das OmpA-Protein von Shigella trägt ebenfalls zur Empfindlichkeit gegenüber 4-59 bei, aber mit viel schwächerer Effizienz (Tab. 11). Das heißt, daß die Region des OmpA-Proteins, die als Bacteriocin-Rezeptor benützt wird, im OmpA von Salmonella und Shigella ähnlich, aber nicht identisch ist und in den anderen OmpA-Proteinen fehlt bzw. von dem Bacteriocin nicht erkannt wird.

Mögliche Rezeptor-Region könnte die um "110" sein (Tab.14). Wäre Position "70" alleine beteiligt, müßte mindestens auch E. coli eine geringe Empfindlichkeit zeigen, da die OmpA-Proteine von E. coli und von Shigella in Position "70" identisch sind.

Region "25" ist als möglicher Rezeptor auszuschließen. E. coli selbst ist gegen das Bacteriocin 4-59 tolerant. Trägt es aber das Hybridgen (siehe Legende Tab. 14) mit dem für Region "25" kodierenden eigenen Genteil und dem für Region "70" und "110" kodierenden Gensegment aus Shigella, ist es empfindlich. Da das Hybridprotein Region "70" und "110" des Shigella OmpA-Proteins trägt, Region "70" von Shigella und E. coli gleich sind, kann die Empfindlichkeit nur durch die "110" Region vermittelt werden.

Bei diesen Überlegungen muß man berücksichtigen, daß für diese Eigenschaften der OmpA-Proteine wesentlich auch ihre

Wechselwirkung mit dem Lipopolysaccharid beiträgt (153). Sie können möglicherweise sowohl mit dem Lipid A (169) als auch mit dem Core-Teil des Oligosaccharids des LPS-Moleküls in Verbindung stehen (153).

Puspurs et al. (166) haben OmpA-Mutanten isoliert, die K3 in einem LPS-Wildtypstamm noch binden. Die gleiche OmpA-Mutante ist aber in einem Stamm mit verändertem LPS resistent gegen Phagen. Das heißt, daß das OmpA nur in Zusammenwirkung mit dem LPS den funktionellen Rezeptor für K3 darstellt.

Das Verhalten der OmpA-Proteine, bedingt durch die variablen Regionen, könnte somit durch folgende Möglichkeiten erklärbar sein. Sie könnten einzig und allein durch ihre Eigenfunktion Rezeptoreigenschaften aufweisen, wobei die 3 variablen Regionen als Rezeptorstellen an der Oberfläche lokalisiert sein könnten. Weiterhin wäre es denkbar, daß sie selbst Rezeptor erst dann darstellen können, wenn sie in einer bestimmten Konformation vorliegen, die ihnen erst durch Wechselwirkung mit anderen Membrankomponenten verliehen wird.

Was immer die primäre Funktion der variablen Regionen in der Rezeptor-Eigenschaft des Proteins ist, ist vorstellbar, daß sie durch den durch Phagen und Colicine ausgeübten Selektionsdruck verursacht wurden.

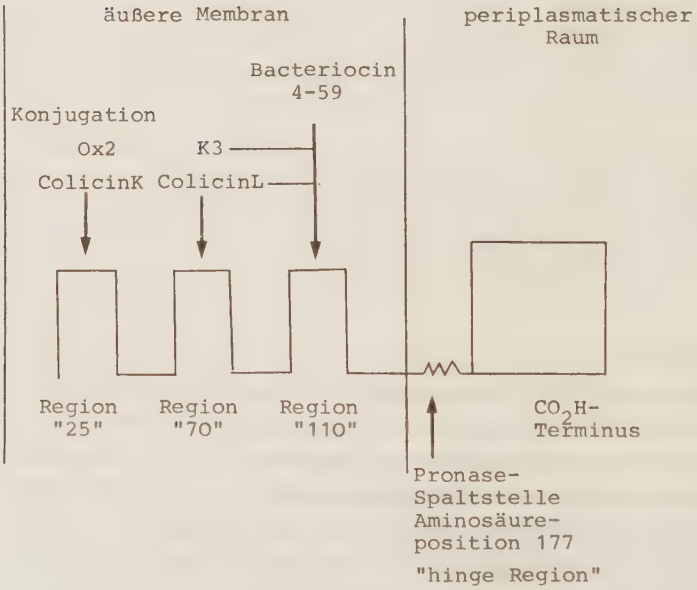
CO_2H-Terminus

Vermutlich übernimmt der CO_2H-terminale Bereich der OmpA-Proteine irgendwelche noch unbekannte physiologischen Funktionen und ist aus dem Grund während der Evolution der OmpA-Proteine stärker als der NH_2-Terminus konserviert geblieben.

Da sich der CO_2H-terminale Teil des Proteins beim E. coli OmpA-Protein durch Einwirkung von Pronase auf Zellwände - nicht aber auf intakte Zellen - kurz vor der Ala-Pro-Region abspalten läßt (29), ist er der ins Periplasma ragende Teil des Proteins. Diese Region wurde bei allen OmpA-Proteinen gefunden. Auf die Ähnlichkeit dieser ungewöhnlichen Struktur

mit den Prolin-reichen Sequenzen der "hinge-Regionen" der Immunglobuline (81, 159) wurde schon früher hingewiesen (29). Dieser Sequenzteil könnte als eine Art Gelenk zwischen Membran-gebundenem und ins Periplasma hängenden Teil des Proteins fungieren. Da Prolin die Ausbildung von α-Helix-Strukturen verhindert (101) kann diese Region in mehr oder weniger gestreckter Form (Polyprolin-Helix) vorliegen und dem CO_2H-Terminus eine gewisse Beweglichkeit verleihen.

Domänenmodell des OmpA-Proteins



(Numerierung der E. coli-Sequenz)

Sequenz-Divergenz der ompA-Gene und ihrer Produkte

Für die Enterobacteriaceae wurden schon einige phylogenetische Stammbäume aufgestellt, wie z.B. die, die auf immunologischen Vergleichen der alkalischen Phosphatase (32) oder auf Vergleichen von ribosomalen Komponenten (79) oder auf in vitro DNA-Hybridisierungsstudien (25) basieren.

Mit den 5 ompA-Nukleotidsequenzen ist es möglich, die Divergenz von bakteriellen Genomen auf DNA-Ebene direkt zu sehen und zu analysieren, welche Stellung die Organismen im phylogenetischen Stammbaum einnehmen. Da bei den zu vergleichenden ompA-Genen sich nicht nur einzelne Basenpaaraustausche ereignet haben, die leicht revertieren können, sondern Austausche sich auch über größere Bereiche erstrecken, ist eine Einordnung sicherer.

Wenn man davon ausgeht, daß Basenpaarsubstitutionen in der für den gut konservierten CO_2H-terminalen Teil kodierenden Region (ab Aminosäurerest 134) mit einer konstanten Rate während der Evolution der ompA-Gene passierten, kann man spekulieren, wie die ompA-Gene der untersuchten Organismen von einem gemeinsamen ompA-Vorläufergen divergierten.

Verglichen mit dem ompA-Gen von Serratia haben sich im ompA-Gen von Shigella 126 Bp-, von Salmonella 137 Bp-, von Enterobacter 123 Bp- und von E. coli 124 Bp-Austausche ereignet. Die Austausche, verglichen mit dem ompA-Gen von Enterobacter, belaufen sich bei Salmonella auf 87 Bp, bei Shigella auf 93 Bp und bei E. coli auf 91 Bp. Die ompA-Gene von Shigella und E. coli besitzen jeweils 56 veränderte Basenpaare im Vergleich mit dem Salmonella-Gen. Alle 4 Gene weisen gleich viele Basenpaar-Austausche, verglichen mit dem Serratia-Gen, auf. Das könnte heißen, daß sich alle aus einem für alle 5 ompA-Gene gemeinsamen ompA-Vorläufergen a entwickelten, wobei das Serratia-Gen sich getrennt entwikkelte.

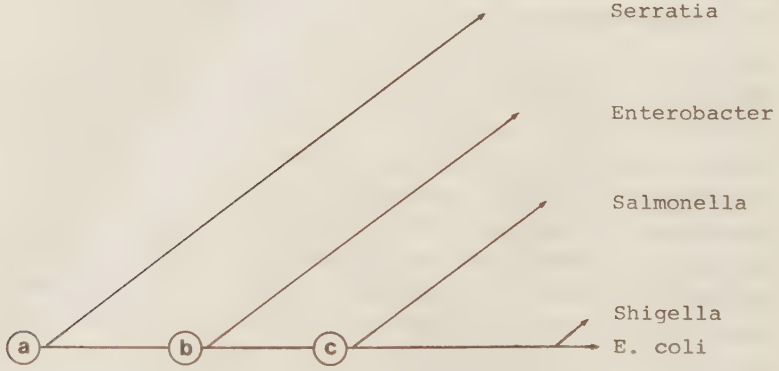
Da die ompA-Gene von Shigella, Salmonella und E. coli ungefähr gleich viele und häufig die gleichen Basenpaar-Austau-

sche, verglichen mit dem Enterobacter-Gen, haben, liegt der Schluß nahe, daß sie während der Evolution gemeinsam und gleichzeitig von einem Vorläufergen b divergierten. Das Enterobacter-Gen entwickelte sich ebenfalls von Gen b aus getrennt weiter. Gen b müßte danach genau wie das Serratia-Gen ein Abkömmling von Gen a sein.

Bei dem Shigella- und dem E. coli-Gen weisen je 56 Bp-Änderungen den Unterschied zum Salmonella-Gen auf. Dabei könnte sich ein gemeinsames Gen c, Abkömmling von Gen b, für die Gene von Shigella, E. coli und Salmonella annehmen lassen, wobei sich Salmonella getrennt weiterentwickelte.

Somit hätte aus einem gemeinsamen Ursprungsgen a die Entwicklung der 5 ompA-Gene ihren Ausgang über 2 weitere hypothetische Vorläufergene (b und c) genommen.

Solche Überlegungen sind mit den stark divergierenden 5'-Termini der ompA-Gene, wo überwiegend Insertionen zu ausgeprägtem Polymorphismus führten, kaum anzustellen.



Dieses Ergebnis paßt gut zu dem von Cocks (32) aufgestellten Stammbaum.

5. Z U S A M M E N F A S S U N G

Die Gene eines Proteins der äußeren Membran (OmpA-Protein) von Shigella dysenteriae, Enterobacter aerogenes und Serratia marcescens wurden kloniert. Alle ließen sich in E. coli ausprägen, und die Produkte wurden in offenbar richtiger Weise in die äußere Membran dieses Organismus eingebaut. Nur das OmpA-Protein von Shigella ist fähig, manche Funktionen des OmpA-Proteins von E. coli zu ersetzen, während OmpA-Proteine von Enterobacter und Serratia keine der bekannten Funktionen des Proteins von E. coli besitzen.

Von den drei klonierten Genen wurden die Nukleotid-Sequenzen ermittelt. Alle Gene besitzen zwei mögliche Promotoren, P1 und P2, wovon der P2-Promotor in allen Genen konserviert ist. Die "Leader"-Sequenzen der untersuchten ompA-Gene hingegen sind sehr verschieden voneinander, und ihre Struktur scheint somit keine biologische Bedeutung zu haben. Den m-RNA's dieser Gene ging die potentielle Möglichkeit zur Sekundärstrukturbildung auch in den Bereichen, wo sie stark variieren, nicht verloren. Das ist eine Erklärung für die Langlebigkeit der mRNA und trägt, zusammen mit der Codonbenützung, sicher zu der starken Ausprägung der Gene bei.

Die aus den Nukleotid-Sequenzen abgeleiteten Primärstrukturen der Proteine zeigen, daß sie einschließlich des von E. coli in der Evolution sehr stark konserviert geblieben sind. In den NH_2-terminalen Teilen der Polypeptide, die ihre Membran-Domänen darstellen, fanden sich an den gleichen Stellen der Sequenzen (um die Reste 25, 70-80 und 110-120) drei variable Bereiche, die durch Deletionen oder/und Insertionen verursacht sind und sehr wahrscheinlich alle an der Oberfläche der Zelle exponiert sind. Diese Bereiche sind für die Adsorption von Phagen und für die Aufnahme von Colicinen von Bedeutung. Es ist zu vermuten, daß die Variabilität durch Selektion gegen die Wirkung der Phagen und Colicine zustande gekommen ist. Bei allen Proteinen ist die

Membran-Domäne mit der periplasmatischen Domäne durch eine Sequenz verbunden, die einem Gelenk vergleichbar ist und die Struktur Ala-Pro-Val-Val-Ala-Pro-Ala-Pro-Ala-Pro-Ala-Pro-Glu-Val oder Val-Val-Ala-Pro-Ala-Pro-Ala-Pro-Ala-Pro-Ala-Pro-Val-Val aufweist. Die periplasmatischen, CO_2H-terminalen Hälften der Proteine sind höher konserviert als ihre Membran-Domänen. Sehr wahrscheinlich haben diese Teile der Proteine bisher unbekannte physiologische Funktionen.

6. L I T E R A T U R V E R Z E I C H N I S

1. Achtman, M., Skurray, R.
in: Microbiol. Interactions (Receptors and Recognition Series B, Vol 3), ed. Reissig, J.L.
Chapman and Hall, London (1977) 233-279

2. Achtman, M., Schwuchow, S., Helmuth, R., Morelli, G. Manning, P.A.
Molec. gen. Genet. 164 (1978) 171-183

3. Achtman, M.
J. Bacteriol. 123 (1975) 505-515

4. Advanced Bacterial Genetics
Davis, R.W., Botstein, D., Roth, J.R. Cold Spring Harbor (1980)

5. Aldea, M., Herrero, E., Esteve, M.I., Guerreno, R.
J. gen. Microbiol. 120 (1980) 355-367

6. Alderman, E.M., Dills, S.S., Melton, T., Dobrogosz, R.
J. Bacteriol. 140 (1979) 369-376

7. Bachman, B.J., Low, K.B.
Microbiol. Rev. 44 (1980) 1-56

8. Beck, E., Bremer, E.
Nucleic Acids Res. 8 (1980) 3011-3027

9. Beher, M.G., Schnaitman, C.A., Pugsley, A.P.
J. Bacteriol. 143 (1980) 906-913

10. Benton, W.D., Davis, R.W.
Science 196 (1977) 180-182

11. Benz, R., Hancock, R.E.W.
Biochim. Biophys. Acta 646 (1981) 298-308

12. Bergy's Manual of Determinative Bacteriology
eds. Buchanan, R.F., Gibbons, N.E.

13. Beveridge, T.J.
International Rev. Cytology 72 (1981) 229-317

14. Birnboim, H.C., Doly, J.
Nucleic Acids Res. 7 (1979) 1513

15. Blobel, G.
in: International Cell Biology (eds. Brinkley, B.R., Porter, K.P.) The Rockefeller University Press New York (1977) 318-325

16. Bolivar, F., Rodriguez, R., Green, P.J., Betlach, M. Heyneker, H.L., Boyer, H.W., Crosa, J., Falkow,S.
Gene 2 (1977) 95-113

17. Boos, W.
Ann. Rev. Biochem. 43 (1974) 123-146

18. Braun, G., Cole, S.T.
Nucleic Acids Res. 10 (1982) 2367-2377

19. Braun, V., Rehn, K.
Eur. J. Biochem. 10 (1969) 426-438

20. Braun, V., Hantke, K.
Ann. Rev. Biochem. 43 (1974) 89-121

21. Braun, V.
Biochim. Biophys. Acta 415 (1975) 335-377

22. Braun, V., Hancock, R.E.W., Hantke, K., Hartmann, A.
J. Supramolec. Struct. 5 (1976) 37-58

23. Bremer, E., Beck, E., Hindennach, I., Sonntag I., Henning, U.
Molec. gen. Genet. 179 (1980) 13-20

24. Bremer, E., Cole, S.T., Hindennach, I., Henning, U., Beck, E., Kurz, C., Schaller,H.
Eur. J. Biochem 122 (1982) 223-231

25. Brenner, D.J., Fanning, G.R., Johnson, K.E., Citarella, R.V., Falkow, S.
J. Bacteriol. 98 (1969) 637-650

26. Chai, T., Foulds, J.
J. Mol. Biol. 85 (1974) 465-474

27. Chang, A.C.Y., Cohen, S.N.
J. Bacteriol. 134 (1978) 1141-1156

28. Chen, R., Krämer, C., Schmidmayr, W., Henning, U.
Proc. Nat. Acad. Sci. USA 76 (1979) 5014-5017

29. Chen, R., Schmidmayr, W., Krämer, C., Chen-Schmeisser, U., Henning, U.
Proc. Nat. Acad. Sci. USA 77 (1980) 4592-4596

30. Chen. R., Krämer, C., Schmidmayr, W., Chen-Schmeisser, U., Henning, U.
Biochem. J. 203 (1982) 33-43

31. Clement, J.M., Hofnung, M.
Cell 27 (1981) 507-514

32. Cocks, G.T., Wilson, A.C.
J. Bacteriol. 110 (1972) 793-802

33. Cohen, S.N., Chany, A.C.Y., Hsu, L.
Proc. Nat. Acad. Sci. USA 69 (1972) 2110-2114

34. Cole, S.T., Bremer, E., Hindennach, I., Henning, U.
Mol. gen. Genet. 189 (1983) 400-404

35. Cole, S.T., Sonntag, I., Henning, U.
J. Bacteriol. 149 (1982) 145-150

36. Cole, S.T., Bremer, E., Hindennach, I., Henning, U.
Mol. gen. Genet. 188 (1982) 472-479

37. Cole, S.T., Chen-Schmeisser, U., Hindennach, I., Henning, U.
J. Bacteriol. 153 (1983) 581-587

38. Cole, S.T., Braun, G., Sonntag, I., Henning, U.
Ann. Microbiol. (Inst. Pasteur) 133A (1982) 209-213

39. Cole, S.T., Guest, J.R.
Mol. gen. Genet. 178 (1980) 409-418

40. Cronan, J.E.
in: Bacterial outer membranes (ed. Inouye, M.)
John Wiley and Sons, New York (1979) 35-65

41. Cronan, J.E., Vagelos, P.R.
Biochim. Biophys. Acta 265 (1972) 25-60

42. Datta, D.B., Arden, B., Henning, U.
J. Bacteriol. 131 (1977) 821-829

43. Datta, D.B., Krämer, C., Henning, U.
J. Bacteriol. 128 (1976) 834-841

44. Davis, B.D., Tai, P.C.
Nature 283 (1980) 433-438

45. Davies, J.K., Reeves, P.
J. Bacteriol. 123 (1975) 102-117

46. Decad, G.M., Nikaido, H.
J. Bacteriol. 128 (1976) 325-336

47. Denhardt, D.T.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 23 (1966) 641

48. Dimasi, D.R., White, J.C., Schnaitman, C.A., Bradbeer, C.
J. Bacteriol. 115 (1973) 506-513

49. DiRienzo, J.M., Nakamura, K., Inouye, M.
Ann. Rev. Biochem. 47 (1978) 481-532

50. Edlund, T., Grundström, T., Normark, S.
Mol. gen. Genet. 173 (1979) 115-125

51. Endermann, R., Krämer, C., Henning, U.
FEBS Lett. 86 (1978) 21-24

52. Endermann, R., Henning, U.
FEBS Lett. 97 (1979) 339-343

53. Fiss, E.H., Stanley-Samuelson, P., Neilands, J.B.
Biochemistry 21 (1982) 4517-4522

54. Fiss, E.H., Hollifield, W.C., Neilands, J.B.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 91 (1979) 29-34

55. Foulds, J.
J. Bacteriol. 110 (1972) 1001-1009

56. Foulds, J.
J. Mol. Biol. 85 (1974) 465

57. Freudl, R., Cole, S.T.
Eur. J. Biochem. 134 (1983) 497-502

58. Gabain, A.v., Belasco, J.G., Schottel, J.L., Chang, A.C.Y., Cohen, S.N.
Proc. Nat. Acad. Sci. USA 80 (1983) 653-657

59. Galanos, C., Lüderitz, O., Rietschel, E.T., Westphal, O.
in: Internat. Rev. Biochem. 14, 239-335
ed. Goodwin, T.W., University Park Press

60. Garten, W., Hindennach, I., Henning, U.
Eur. J. Biochem. 59 (1975) 215-221

61. Gottesman, S., Halpern, E., Trisler, P.
J. Bacteriol. 148 (1981) 265-273

62. Gouy, M., Gautier, C.
Nucleic Acids Res. 10 (1982) 7055-7074

63. Grunstein, M., Hogness, D.S.
Proc. Nat. Acad. Sci. USA 72 (1975) 3961

64. Haddock, B.A., Jones, C.W.
Bacteriol. Rev. 41 (1977) 47-99

65. Hall, M.H., Silhavy, T.J.
J. Mol. Biol. 151 (1981) 1-15

66. Hantke, K.
FEBS Lett. 70 (1976) 109-112

67. Hashimoto-Gotoh, T., Franklin, F.C.H., Nordheim, A., Timmis, K.N.
Gene 16 (1981) 227-235

68. Havekes, L.M., Hoekstra, W.P.M.
J. Bacteriol. 126 (1976) 593-600

69. Hazelbauer, G.L.
in: Bacterial outer membranes (ed. Inouye, M.)
John Wiley and Sons, New York (1979) 449-473

70. Hearne, P., Nokelainen, M., Ponticelli, A., Hirota, Y., Ito, K., Wickner, W.

71. Heller, K.B.
J. Bacteriol. 134 (1978) 1181-1183

72. Henning, U., Sonntag, I., Hindennach, I.
Eur. J. Biochem. 92 (1978) 491-498

73. Henning, U., Royer, H.D., Teather, R.M., Hindennach, I., Hollenberg, C.P.
Proc. Nat. Acad. Sci. USA 76 (1979) 4360-4364

74. Henning, U., Haller, I.
FEBS Lett. 55 (1975) 161-164

74a Henning, U., Hindennach, I., Haller, I.
FEBS Lett. 61 (1976) 46-48

75. Henning, U.
Ann. Rev. Biochem. 43 (1975) 45-60

76. Hindennach, I., Henning, U.
Eur. J. Biochem. 59 (1975) 207-213

77. Hirashima, A., Childs, G., Inouye, M.
J. Mol. Biol. 79 (1973) 373-379

78. Hirota, Y., Suzuki, H., Nishimura, Y., Yasuda, S.
Proc. Nat. Acad. Sci. USA 74 (1977) 1417-1420

79. Hori, H.
Mol. gen. Genet. 145 (1976) 119-123

80. Huang, Y.-X., Ching, G., Inouye, M.
J. Biol. Chem. 258 (1983) 8139-8145

81. Huber, R., Deisenhofer, J., Colman, P.M., Matsushima, M., Palm, W.
Nature 264 (1976) 415-420

82. Huisman, O., D'Ari, R., George, J.
Mol. gen. Genet. 177 (1980) 629-636

83. Huisman, O., D'Ari, R.
Nature 290 (1981) 797-799

84. Humphreys, G.O., Willshaw, G.A., Anderson, E.A.
Biochim. Biophys. Acta 383 (1975) 457-463

85. Ikemura, T.
J. Mol. Biol. 146 (1981) 1-21

86. Ikemura, T.
J. Mol. Biol. 151 (1981) 389-409

87. Inouye, M.
in: Biomembranes (ed. Manson, L.A.)
Plenum Press, New York 10 (1979) 141-208

88. Inouye, M., Shaw, J., Shen, C.
J. Biol. Chem. 247 (1972) 8154-8159

89. Ish-Horowicz, D., Burke, J.F.
Nucleic Acids Res. 9 (1981) 2989-2998

90. Ito, K., Bassford, P.J., Beckwith, J.
Cell 24 (1981) 707-717

91. Jones, N.C., Osborn, M.J.
J. Biol. Chem. 252 (1977) 7405-7412

92. Kaiser, K., Murrey, N.E.
Molec. gen. Genet. 175 (1979) 159-174

93. Kamio, Y., Nikaido, H.
Biochem. 15 (1976) 2561-2570

94. Kay, D., Fildes, P.
J. gen. Microbiol. 27 (1961) 143-146

95. Kelly, R.B., Cozzarelli, N.R., Deutscher, M.P.,
Lehmann, I.R., Kornberg, A.
J. Biolog. Chem. 245 (1970) 39-45

96. Koniski, J.
in: Bacterial outer membranes (ed. Inouye, M.)
John Wiley and Sons, New York (1979) 319-359

97. Kortelund, J., Tommassen, J., Lugtenberg, B.
Biochim. Biophys. Acta 690 (1982) 282-289

98. Krieger-Brauer, H.J., Braun, V.
Arch.Microbiol. 124 (1980) 233-242

99. Laskey, R.A., Mills, A.D.
Eur. J. Biochem. 56 (1975) 335-341

100. Laskey, R.A., Mills, A.D.
FEBS Lett. 82 (1977) 314

101. Lehninger,A.L.
Biochemistry, Worth Publishers, Inc., New York

102. Levy, S.B.
Proc. Nat. Acad. Sci. USA 72 (1975) 2900-2904

103. Luckey, M., Nikaido, H.
Proc. Nat. Acad. Sci. 77 (1980) 167-171

104. Lugtenberg, B., Peters, R., Bernheimer, H., Berendsen, W.
Molec. gen. Genet. 147 (1976) 251-262

105. Lugtenberg, B., Meyers, J., Peter, R., Van der Hoek, P., Van Alphen, L.
FEBS Lett. 58 (1975) 254-258

106. Lugtenberg, B., Van Alphen, L.
Biochim. Biophys. Acta 737 (1983) 51-115

107. Mallick, U., Herrlich, P.
Proc. Nat. Acad. Sci. USA 76 (1979) 5520-5523

108. Maniatis. T., Fritsch, E.F., Sambrook,J.
Molecular Cloning, Cold Spring Harbor (1982)

109. Maniatis, T., Hardison, R.C., Lacy, E., Lauer, J., O'Connell, C., Quon, D.
Cell 15 (1978) 687-701

110. Manning, P.A., Puspurs, A., Reeves, P.
J. Bacteriol. 127 (1976) 1080-1084

111. Manning, P.A., Reeves, P.
Molec. gen. Genet. 158 (1978) 279-286

112. Manoil, C., Rosenbusch, J.P.
Mol. gen. Genet. 187 (1982) 148-156

113. Manoil, C.
J. Mol. Biol. 169 (1983) 507-519

114. Marvin, D., Hohn, B.
Bacteriol. Rev. 33 (1969) 172-209

115. Maxam, A.M., Gilbert, W.
Proc. Nat. Acad. Sci. USA 74 (1977) 560-564

116. Maxam, A.M., Gilbert, W.
in: Methods in Enzymology (ed. Grossman, L., Moldave, K.)
Academic Press, New York (1980) 499-560

117. Messing, J., Gronenborn, B., Müller-Hill, B.,
Hofschneider, P.H.
Proc. Nat. Acad. Sci. USA 74 (1977) 3642-3646

118. Messing, J., Vieira, J.
Gene 19 (1982) 269-276

119. Messing, J., Crea, R., Seeburg, P.H.
Nucleic Acid Res. 9 (1981) 309-321

120. Miara, T., Mizushima, S.
Biochim. Biophys. Acta 150 (1968) 159-161

121. Michaelis, S., Beckwith, J.
Ann. Rev. Microbiol. 36 (1982) 435-465

122. Mirelman, D.
in: Bacterial outer membranes (ed. Inouye, M.)
John Wiley and Sons, New York (1979) 115-166

123. Mizuno, T., Wurtzel, E.T., Inouye, M.
J. of Bacteriol. 150 (1982) 1462-1466

124. Movva, N.R., Nakamura, K., Inouye, M.
Proc. Nat. Acad. Sci. USA 77 (1980a) 3845-3849

125. Movva, N.R., Nakamura, K., Inouye, M.
J. Mol. Biol. 143 (1980) 317-328

126. Mühlrad, P., Golecki, J.
Eur. J. Biochem. 51 (1975) 343-352

127. Nakae, T., Nikaido, H.
J. Biol. Chem. 250 (1975) 7359-7365

128. Nakae, T.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 71 (1976) 877-884

129. Nakae, T., Ishii, J., Tokunaga, M.
J. Biol. Chem. 254 (1979) 1457-1461

130. Nakae, T.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 88 (1979) 774-781

131. Nakamura, W., Mizushima, S.
J. Biochem. 80 (1976) 1411-1422

132. Nakamura, K., Inouye, M.
Cell 18 (1979) 1109-1117

133. Nakamura, K., Inouye, M.
Proc. Nat. Acad. Sci. USA 77 (1980) 1369-1373

134. Nakamura, K.R., Pirtle, M., Inouye, M.
J. Bacteriol. 137 (1979) 595-604

135. Neilands, J.B.
Annu. Rev. Biochem. 50 (1981) 715-731

136. Neilands, J.B.
Annu. Rev. Microbiol. 36 (1982) 285-309

137. Neu, H.C., Heppel, L.A.
J. Biol. Chem. 240 (1965) 3685-3692

138. Nikaido, H.
in: Bacterial outer membranes (ed. Inouye, M.)
John Wiley and Sons, New York (1979) 361-401

139. Nikaido, H., Rosenberg, E.Y., Foulds, J.
J. Bacteriol. 153 (1983) 232-240

140. Nikaido, H.
in: Bacterial outer membranes (ed. Inouye, M.)
John Wiley and Sons, New York (1979) 132-208

141. Normark, K.S., Burmann, L.G.
J. Bacteriol. 132 (1977) 1-7

142. Ørskov, I., Ørskov, F., Jann, B., Jann, K.
Bacteriol. Rev. 41 (1977) 667-710

143. Osborn, M.J.
in: Bacterial outer membranes (ed. Inouye, M.)
John Wiley and Sons, New York (1979) 14-34

144. Osborn, M.J., Wu, H.C.P.
Ann. Rev. Microbiol. 34 (1980) 369-422

145. Osborn, M.J.
in: Structure and Function of Biological Membranes
(ed. Rothfield, L.I.)
Academic Press New York (1971) 343-400

146. Oudega, B., Claasen-Boor, P., Sneeuwloper, G.,
de Graaf, F.K.
Eur. J. Biochem. 78 (1977) 445-453

147. Overbee, N., Lugtenberg, B.
J. Mol. Biol. (im Druck)

148. Overbeeke, N., Van Scharrenburg, G., Lugtenberg, B.
Eur. J. Biochem. 110 (1980) 247-254

149. Overbeeke, N., Lugtenberg, B.
FEBS Lett. 112 (1980) 229-232

150. Overbeeke, N., Lugtenberg, B.
J. gen. Microbiol. 121 (1980) 373-380

151. Oxender, D.L.
Ann. Rev. Biochem. 41 (1972) 777-814

152. Post, L.E., Nomura, M.
J. Biol. Chem. 255 (1980) 4660-4666

153. Puspurs, A., Medon, P., Corless, C., Hackett, J., Reeves, P.
Mol. gen. Genet. 189 (1983) 162-165

154. Randall-Hazelbauer, L., Schwartz, M.
J. Bacteriol. 116 (1973) 1436-1446

155. Reeves, P.
in: Bacterial outer membranes (ed. Inouye, M.)
John Wiley and Sons, New York (1979) 255-291

156. Reithmeier, R.A.F., Bragg, P.D.
FEBS Lett. 41 (1974) 195-198

157. Richardson, C.C.
Proc. Nat. Acad. Sci. USA 54 (1965) 158

158. Ridgeway, H.F., Silverman, M., Simon, M.J.
J. Bacteriol. 132 (1977= 657-665

159. Roitt, I.
Immunologie, Steinkopff-Verlag, Darmstadt (1977)

160. Rosenberg, M., Court, D.
Ann. Rev. Genet. 13 (1979) 319-353

161. Rothfield, L.I. (ed.)
Structure and Function of Biological Membranes
Academic Press, New York (1971)

162. Sanger, F., Coulson, A.R., Barrell, B.G., Smith, A.J.H., Roc, B.A.
J. Mol. Biol. 143 (1980) 161-178

163. Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A.R.
Proc. Nat. Acad. Sci. USA 74 (1977) 5463-5467

164. Schleifer, K.H., Kandler, O.
Bacteriol. Rev. 36 (1972) 407-477

165. Schmitges, C.J., Henning, U.
Eur. J. Biochem. 63 (1976) 47-52

166. Schnaitman, C.A.
Arch. Biochem. Biophys. 157 (1973) 541-552

167. Schwartz, M.
in: Virus Receptors Part 1 (ed. Randall, L., Philipson, L.)
Chapman and Hall, London (1980) 59-94

168. Schweizer, M., Henning, U.
J. Bacteriol. 129 (1977) 1651-1652

169. Schweizer, M., Hindennach, I., Garten, W., Henning, U.
Eur. J. Biochem. 82 (1978) 211-217

170. Scott, N.W., Harwood, C.R.
FEMS Microbiol. Lett. 9 (1980) 95-98

171. Siebenlist, U., Simpson, R.B., Gilbert, W.
Cell 20 (1980) 269-281

172. Skurray, R., Hancock, R.E.W., Reeves, P.
J. Bacteriol. 119 (1974) 726-735

173. Smit, J., Kamio, Y., Nikaido, H.
J. Bacteriol. 124 (1975) 942-958

174. Smith, D., Calvo, J.
Nucleic Acids Res. 7 (1980)

175. Smith, H.O., Birnstiel, M.L.
Nucleic Acids Res. 3 (1976) 2387-2398

176. Sonntag, J., Schwarz, H., Hirota, Y., Henning, U.
J. Bacteriol. 136 (1978) 280-285

177. Southern, E.M.
J. Molec. Biol. 98 (1975) 503-517

178. Staden, R.
Nucleic Acids Res. 6 (1979) 2601-2610

179. Staden, R.
Nucleic Acids Res. 8 (1980) 3673-3694

180. Staden, R., Mahachlan, A.D.
Nucleic Acids Res. 10 (1982) 141-156

181. Staden, R.
Nucleic Acids Res. 10 (1982) 2951-2961

182. Stocker, B.A.D., Nurminen, M., Mäkelä, P.H.
J. Bacteriol. 139 (1979) 376-383

183. Sutcliff, J.G.
Nucleic Acids Res. 5 (1978) 2721

184. Suzuki, H., Nishimura, Y., Yasuda, S., Nishimura, A., Yamada, M., Hirota, Y.
Mol. gen. Gent. 167 (1978) 1-9

185. Szmelcman, S., Hofnung, M.
J. Bacteriol. 124 (1975) 112-118

186. Szmelcman, S., Schwartz, M.
Eur. J. Biochem. 65 (1976) 13-19

187. Tinico, I., Borer, P.N., Dengler, B., Levine, M.D., Uhlenbeck, O.C., Crothers, D.M., Gralla, J.
Nature 246 (1973) 40-41

188. Tommassen, J., Lugtenberg, B.
J. Bacteriol. 147 (1980) 118-123

189. Tommassen, J., de Geus, P., Lugtenberg, B., Hackett, J., Reeves, P.
J. Mol. Biol. 157 (1982) 265-274

190. Tommassen, J., Van der Leig, P., Van der Ende, A., Bergmans, H., Lugtenberg, B.
Mol. gen. Genet. 185 (1982) 105-110

191. Tommassen, J., Overduin, P., Lugtenberg, B., Bergmans, H.
J. Bacteriol. 149 (1982) 668-672

192. Uemura, J., Mizushima, S.
Biochim. Biophys. Acta 413 (1975) 163-176

193. Uhlin, B.E., Nordstrom, K.
Molec. gen. Genet. 165 (1978) 167-179

194. Van Alphen, W., Van Boxtel, R., Van Selm, N., Lugtenberg, B.
FEMS Microbiol. Lett. 3 (1978) 103-106

195. Van Alphen, W., Havekes, L., Lugtenberg, B.
FEBS Lett. 75 (1977) 285-290

196. Van Alphen, W., Van Selm, N., Lugtenberg, B.
Molec. gen. Genet. 159 (1978) 75-83

197. Wahl, G.M., Stern, M., Stark, G.R.
Proc. Nat. Acad. Sci. USA 76 (1979) 3683-3687

198. Wanner, B.L., Wieder, S., McSharry, R.
J. Bacteriol. 146 (1981) 93-101

199. Wells, J.R., Brunk, C.F.
Anal. Biochem. 97 (1979) 196-201

200. White, D.A., Lennarz, W.J., Schnaitman, C.A.
J. Bacteriol. 109 (1972) 686-690

201. Will, B.M., Bayer, A.A., Finnegan, D.J.
J. Mol. Biol. 153 (1981) 897-915

202. Wilson, G.G., Murray, N.E.
J. Mol. Biol. 132 (1979) 471-479

203. Wright, A., Kanegasaki, S.
Physiol. Rev. 51 (1971) 748-784

204. Yamamoto, K.R., Alberts, B.M., Benzinger, R., Lawhorne, L., Theiber, G.
Virology 40 (1970) 734-744

205. Yamoto, J., Hinz,U.
Ann. Microbiol. (Inst. Pasteur) 133A (1982) 205-207

206. Zimmerman, R., Wickner, W.
J. Biol. Chem, 258 (1983) 3920-3925

Lebenslauf

Name:		Gabriele Braun
Geburtsdatum:		22.3.1954
Geburtsort:		Karlsruhe
Staatsangehörigkeit:		deutsch
Schule:	1961 - 1965	Volksschule Eppingen
	1965 - 1973	Gymnasium Eppingen
Studium:	1973 - 1975	Studium an der Universität (TH) Karlsruhe für das Lehramt an Gymnasien mit der Fächerkombination Biologie und Chemie
	1975 - 1981	Diplom-Studiengang für Biologie an der Eberhard-Karls-Universität Tübingen
	1977	Vordiplom
	1980	mündliche Diplomprüfung
	1980 - 1981	Diplomarbeit an der Universität Tübingen am Institut für Mikrobiologie II bei Prof. Dr. V. Braun
	1981 - 1983	Anfertigung der vorliegenden Arbeit am Max-Planck-Institut in Tübingen bei Prof. Dr. U. Henning

Meine akademischen Lehrer:

W. Bessler, V. Braun, D. Bunke, D. Drautz, H.P. Fiedler, K.G. Grell, J. Guglielmi, K-P. Hadeler, K. Hantke, V. Hemleben, U. Henning, J.V. Höltje, G. Jung, W. Löffler, C. Meier-Brook, F. Oberwinkler, C. Pelling, H. Probst, W. Rähle, A. Rieker, B. Röttger, B. Schwemmle, W. Seyffert, H. Tichy, P. Wenk, G. Winkelmann, K. Wohrmann, H. Wolf, H. Zähner